

El mundo de la célula

6ª edición

Wayne M. Becker
Lewis J. Kleinsmith
Jeff Hardin

PEARSON
Addison Wesley

EL MUNDO DE LA CÉLULA

EL MUNDO DE LA CÉLULA

SEXTA EDICIÓN

WAYNE M. BECKER
University of Wisconsin, Madison
LEWIS J. KLEINSMITH
University of Michigan, Ann Arbor
JEFF HARDIN
University of Wisconsin, Madison

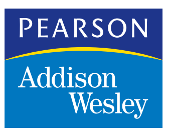
Colaboración Capítulos 9-12 **GREGORY PAUL BERTONI**

Traducción y revisión técnica

Íñigo Azcoitia Elías
Alberto Muñoz Céspedes
Facultad de Biología
Universidad Complutense de Madrid

Equipo de traducción

Íñigo Azcoitia Elías
Facultad de Biología
Universidad Complutense de Madrid
Lidia Blázquez-Llorca
Instituto de Neurobiología Ramón y Cajal, CSIC
M.ª del Pilar Cano Barquilla
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid
Marta del Álamo Camuñas
Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa»
Universidad Autónoma de Madrid
Pilar Fernández Mateos
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid
Alberto Muñoz Céspedes
Facultad de Biología
Universidad Complutense de Madrid
Sergio Veiga Herreros
Instituto de Neurobiología Ramón y Cajal, CSIC



Madrid • México • Santafé de Bogotá • Buenos Aires • Caracas • Lima • Montevideo
San Juan • San José • Santiago • São Paulo • Reading, Massachusetts • Harlow, England

Datos de catalogación bibliográfica

EL MUNDO DE LA CÉLULA
Wayne M. Becker, Lewis J. Kleinsmith y Jeff Hardin

PEARSON EDUCACIÓN, S.A., Madrid, 2007

ISBN 10: 84-205-5013-2
ISBN 13: 978-84-205-5013-8

Materia: Células, 576

Formato: 215 × 270 Páginas: 1008

Ribera del Loira, 28
28042 Madrid (España)

EL MUNDO DE LA CÉLULA
Wayne M. Becker, Lewis J. Kleinsmith y Jeff Hardin

ISBN 10: 84-205-5013-2
ISBN 13: 978-84-205-5013-8

Depósito Legal:

ADDISON WESLEY es un sello editorial autorizado de PEARSON EDUCACIÓN, S.A.

Authorized translation from the English language edition, entitled WORLD OF THE CELL, 6TH Edition by BECKER, WAYNE M.; KLEINSMITH, LEWIS J.; HARDIN, JEFF, published by Pearson Education Inc, publishing as Benjamin Cummings, Copyright © 2006

Equipo editorial:
Editor: Miguel Martín-Romo
Técnico editorial: Marta Caicoya

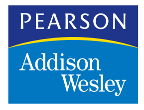
Equipo de producción:
Director: José A. Clares
Técnico: José A. Hernán

Diseño de cubierta: Equipo de diseño de Pearson Educación, S.A.

Composición: COPIBOOK, S.L.

Impreso por:

IMPRESO EN ESPAÑA - PRINTED IN SPAIN



Este libro ha sido impreso con papel y tintas ecológicos

CONTENIDO BREVE

CONTENIDO

Capítulo 21

Expresión génica: I. El código genético y la transcripción 709

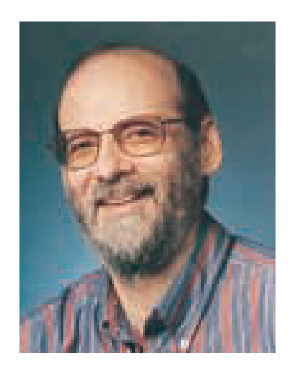
Capítulo 22

Expresión génica: II. Síntesis y clasificación de proteínas 747

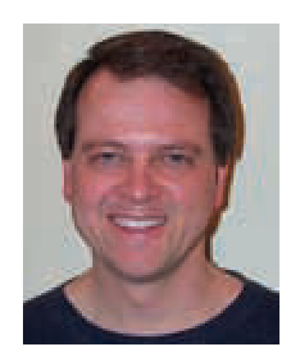
ACERCA DE LOS AUTORES



WAYNE M. BECKER ha impartido clases sobre biología celular en la Universidad de Wisconsin, Madison, durante treinta años, hasta su reciente jubilación. Su interés por escribir libros de texto parte de las notas, esquemas y conjuntos de problemas que ha reunido para sus estudiantes y que ha culminado en el título *Energy and the Living Cell*, un libro sobre bioenergía publicado en 1997, y *The World of the Cell*, cuya primera edición apareció en 1986. Ha obtenido todos sus títulos en la Universidad de Wisconsin, Madison. Los tres títulos están relacionados con la Bioquímica , una orientación fácilmente perceptible en sus libros de texto. Sus intereses en la investigación se han centrado en la biología molecular de las plantas y específicamente en la regulación de la expresión de los genes que codifican las enzimas del sistema foto-respiratorio. Su interés por la enseñanza, el aprendizaje y la investigación le ha llevado a invertir sus años sabáticos en la Universidad de Harvard, la Universidad de Edimburgo, la Universidad de Indonesia, la Universidad de Puerto Rico, la Universidad de Canterbury en Christchurch, Nueva Zelanda, la Universidad China de Hong Kong y la Universidad Charles de Praga. Entre sus galardones se incluyen el premio Chancellor al mérito educativo, sendas distinciones Guggenhein y Fullbright y un premio de la Royal Society de Londres.



LEWIS J. KLEINSMITH es profesor emérito de Biología molecular, celular y desarrollo en la Universidad de Michigan, donde ha trabajado desde que obtuvo su título de doctor en la Universidad Rockefeller en 1968. Ha impartido cursos de introducción a la Biología, de biología de la célula y de biología del cáncer y entre sus actividades de investigación se incluyen estudios sobre el control del crecimiento de las células cancerígenas, el papel de la fosforilación de las proteínas en la regulación de genes eucarióticos y el control de la expresión genética durante el desarrollo. Entre sus numerosas publicaciones se encuentra el título *Principles of Cell and Molecular Biology*, publicado por primera vez en 1988, y varios programas software educativo que han merecido diversos galardones. Sus méritos incluyen una beca Guggenheim, el premio Henry Russell, el premio Michigan Distinguished Service Award, menciones destacadas de la Asociación de estudiantes de Michigan, una distinción Thurnau Professorship, un premio NIH Plain Language Award y un galardón Best Curriculum Innovation Award de EDUCOM Higher Education Software Awards Competition.



JEFF HARDIN es profesor en el Departamento de Zoología de la Universidad de Wisconsin, Madison. Sus investigaciones se han centrado en la migración y adherencia de las células para cambiar la forma de los embriones de animales. Las enseñanzas de Hardin se han beneficiado notablemente del uso de videomicroscopios y de materiales de formación basados en la Web, que se utilizan en muchas universidades de Estados Unidos y de otros países. Como parte de sus intereses académicos en la enseñanza de la Biología, Jeff Hardin ha estado involucrado en varias iniciativas orientadas a la formación. Fue miembro fundador de la Academia de Formación de la Universidad de Wisconsin y cofundador de una iniciativa de sistemas de tecnología formativa en la misma universidad, iniciativa conocida con el nombre de BioWeb. Actualmente dirige el Departamento de Biología, impartiendo un curso de cuatro semestres en Biología fundamental. Entre los premios a la enseñanza que ha recibido se encuentran un galardón Lily Teaching y un premio para jóvenes investigadores de la National Science Foundation. También forma parte del comité editorial de *Cell Biology Education.*

PRÓLOGO

«Porque realmente disfrutamos trabajando con los estudiantes que todavía no se han licenciado y pensamos que deberían disponer de libros de texto sobre Biología claramente escritos, que hagan interesante el tema de estudio al lector y que de alguna manera le ayuden a apreciar no sólo cuánto ya sabemos sobre Biología (en nuestro caso, sobre la Biología de la célula), sino todo lo que todavía nos queda por investigar y descubrir». Así es como responderíamos cualquiera de los tres autores de este libro si nos preguntaran por qué hemos invertido tanto tiempo en escribir y revisar *El mundo de la célula*. Cada uno de nosotros tiene una larga experiencia en la impartición de cursos sobre la Biología de la célula y las áreas relacionadas y atesoramos nuestros contactos con los estudiantes como uno de los aspectos más apreciados de la labor de profesor universitario.

Al reflexionar sobre los cambios que hemos visto en nuestros cursos a lo largo de los años, nos hemos dado cuenta de que las décadas pasadas han visto un crecimiento explosivo en nuestra comprensión de las propiedades y funciones de las células de los seres vivos. Esta enorme profusión de información ha representado un auténtico reto cuando hemos tenido que enfrentarnos a la tarea de mantener actualizado *El mundo de la célula*, ya que había que conseguir que el libro tuviera el tamaño adecuado y fuera fácilmente comprensible para los estudiantes que abordan por primera vez el campo de la Biología celular y molecular. Esta sexta edición es nuestro intento más reciente de alcanzar esos objetivos. Como en las ediciones anteriores, cada uno de nosotros ha aportado su propia experiencia como autor y profesor, y hemos tratado de aunarlas para conseguir un beneficio mutuo, un punto de vista que esperamos que los lectores compartan.

Uno de los principales objetivos de esta edición ha sido actualizar el contenido del texto, especialmente en las áreas de la Biología celular y molecular contemporáneas, donde la velocidad de las investigaciones es enorme y los recientes hallazgos son particularmente significativos. También hemos mantenido los tres objetivos centrales que han caracterizado cada una de las ediciones anteriores. Como siempre, nuestro principal objetivo ha sido presentar a los estudiantes los principios fundamentales que rigen la organización y función celular. En segundo lugar, pensamos que es importante que los estudiantes comprendan algunas de las pruebas científicas críticas que llevan a la formulación de estos conceptos básicos. Por último, hemos pretendido cumplir estos objetivos escribiendo un libro de longitud adecuada, que pueda leerse con comodidad y ser comprendido por los estudiantes que se inician en la Biología celular ¡y que quepa en sus mochilas! Para conseguir este tercer objetivo hemos tenido que ser selectivos tanto en lo que se refiere a los tipos de ejemplos elegidos para ilustrar los conceptos clave como a la cantidad de pruebas científicas incluidas. En otras palabras, hemos intentado mantenernos fieles al propósito principal de las ediciones anteriores: presentar los principios esenciales, los procesos y la metodología de la Biología celular y molecular tan claramente como ha sido posible.

Contenido

En esta edición hemos añadido un nuevo capítulo final, sobre células cancerosas, que proporciona la oportunidad de reunir muchos aspectos del comportamiento celular y de mostrar cómo la investigación de la biología de las células cancerosas nos ha permitido profundizar en nuestro conocimiento de las células normales.

Las principales características del libro, que hemos procurado cuidadosamente mantener desde las anteriores ediciones, e incluso hemos mejorados en algunos casos, son las siguientes:

- La organización de los temas puede adaptarse fácilmente a una amplia variedad de cursos.
- Cada capítulo se ha subdividido en una serie de secciones conceptuales, comenzando cada una de ellas con una frase que resume el concepto que se va a describir.
- Se utilizan frecuentemente figuras que describen estructuras o procesos complicados con unas breves pinceladas, antes de examinar los detalles con mayor profundidad en el texto y las figuras siguientes.
- Un uso selectivo y cuidado de micrografías, que van acompañadas en la mayoría de los casos de ampliaciones.
- Se han incluido problemas que pretenden animar a la aplicación de la información expuesta, incluyendo en cada caso varios problemas de mayor dificultad, identificados mediante puntos rojos, que pretenden probar la capacidad de razonamiento y las habilidades para la resolución de problemas de los estudiantes especialmente capacitados.
- Se ha hecho especial hincapié en las pruebas experimentales que subrayan nuestros conocimientos sobre la estructura y la función de la célula, con el fin de que los lectores tengan presente que los avances en la Biología celular, como en todas las ramas de la Ciencia, no proceden de los profesores universitarios que imparten clases ni de los autores de libros, sino de los investigadores que trabajan en los laboratorios.
- Se ha puesto especial cuidado en la precisión y coherencia, en la terminología utilizada y en la legibilidad, con el fin de minimizar confusiones y maximizar la comprensión del lector.
- Se ha incluido un Glosario que contiene definiciones y referencias de páginas para todos los términos clave escritos en negrita en cada capítulo (más de 1.500 términos en total). El Glosario constituye, en sí mismo, un verdadero «diccionario de Biología celular».
- En el Apéndice se ha incluido una exposición de los principios y técnicas microscópicas, con el fin de proporcionar a los estudiantes acceso a información detallada sobre una amplia variedad de técnicas microscópicas, incluyendo técnicas avanzadas de microscopía óptica para procesamiento de imágenes y manipulación de procesos moleculares.

Características pedagógicas

Para mejorar aún más la efectividad de este texto como herramienta de formación, cada capítulo tiene las siguientes características pedagógicas:

- Cada capítulo está dividido en una serie de secciones conceptuales que se resaltan mediante un *encabezado de enunciación de concepto* que resume el concepto que se va a describir, lo que ayuda a los estudiantes a centrarse en los puntos principales de lo que están estudiando, y ayuda también a la hora de repasar el texto.
- Cada capítulo contiene uno o más *recuadros de ensayo* para ayudar a los estudiantes a comprender aspectos particularmente importantes o intrigantes de la biología de la célula. Algunos de los ensayos proporcionan interesantes perspectivas históricas acerca del modo en que se desarrolla la ciencia, como por ejemplo, el descubrimiento de la estructura doblemente helicoidal del ADN como se describe en el Anexo 3A. Otros ensayos tienen la intención de ayudar a los lectores a comprender principios especialmente difíciles, tal como el ensayo que emplea la analogía de los monos pelando cacahuetes para explicar la cinética de las enzimas (Anexo 6A). Otros recuadros proporcionan detalles adicionales sobre técnicas contemporáneas utilizadas por los biólogos celulares, como sucede por ejemplo en la descripción de la toma de «huellas dactilares» del ADN en el Anexo 18C. Por último, otro papel de los recuadros de ensayo es describir aplicaciones de los resultados de investigación en biología celular, como se ilustra en el análisis dedicado a la fibrosis quística y las perspectivas de la terapia genética en el Anexo 8B.
- La inclusión de un *conjunto de problemas* al final de cada capítulo refleja nuestra convicción de que la ciencia se aprende no sólo leyendo o escuchando, sino fundamentalmente practicando. Los problemas están diseñados para enfatizar la comprensión y la aplicación de los conceptos, por oposición a la mera memorización. Muchos de los problemas han sido planteados en cursos reales, habiendo sido seleccionados de entre los conjuntos de problemas y exámenes que los autores hemos empleado en nuestros propios cursos.
- Las **negritas** se utilizan para resaltar los términos más importantes de cada capítulo, todos los cuales se definen en el Glosario. Las *cursivas* se usan para identificar términos técnicos adicionales que son menos importantes que los términos en negrita, pero que también son significativos. Ocasionalmente, las cursivas se utilizan también para resaltar frases importantes.
- Al final de cada capítulo se incluye una lista de *Lecturas recomendadas*, poniendo un énfasis especial en los artículos de revisión y en publicaciones de investigación cuidadosamente seleccionadas que resultarán perfectamente comprensibles para los usuarios motivados. Hemos intentado evitar abrumar a los lectores con largas bibliografías repletas de títulos técnicos originales, habiendo preferido hacer referencia a artículos que sean especialmente relevantes para los temas del capítulo. En la mayoría de los capítulos, hemos incluido unas cuantas publicaciones históricas de especial importancia, que están marcadas con puntos rojos para alertar al lector acerca de su significado histórico.

Técnicas y métodos

A lo largo del texto, hemos tratado de explicar no sólo *qué* conocemos acerca de las células, sino también *cómo* sabemos lo que sabemos. Con este fin, hemos incluido descripciones de técnicas y resultados experimentales en todos los capítulos, casi siempre en el contexto de las cuestiones abordadas en el capítulo y como anticipación de las respuestas que en él se proporcionan. Por ejemplo, la electroforesis con gel de poliacrilamida se presenta no en un capítulo donde simplemente se cataloguen diversos métodos para el estudio de las células, sino en el Capítulo 7, que es donde cobra importancia de cara a comprender cómo pueden separarse unas de otras las proteínas de las membranas. De forma similar, la centrifugación de densidad de equilibrio se describe en el Capítulo 12, donde resulta esencial para comprender cómo se distinguieron originalmente los lisosomas de las mitocondrias y, posteriormente, de los perixomas.

Sugerencias y comentarios

El verdadero reto al que se enfrenta todo libro de texto es el de demostrar su utilidad a la hora de ayudar a que los profesores enseñen y los estudiantes aprendan. Agradecemos cualquier sugerencia de los lectores, y trataremos de responder a todos los mensajes recibidos. Pueden enviarse los comentarios, críticas y sugerencias a los autores correspondientes:

Capítulos 1-12: Wayne M. Becker
Departamento de Botánica
Universidad de Wisconsin-Madison
Madison, Wisconsin 53706
Estados Unidos
e-mail: wbecker@wisc.edu

Capítulos 13-17 y Apéndice:
Jeff Hardin
Departamento de Zoología
Universidad de Wisconsin-Madison
Madison, Wisconsin 53706
Estados Unidos
e-mail: jdhardin@wisc.edu

Capítulos 18-24 y Glosario:
Departamento de Biología molecular, celular y del desarrollo
Universidad de Michigan
Ann Arbor, Michigan 48109
Estados Unidos
e-mail: lewisk@umich.edu

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer las contribuciones de las numerosas personas que han hecho este libro posible. Estamos en deuda, especialmente, con los muchos estudiantes cuyas palabras de apoyo actuaron como catalizadores a la hora de escribir estos capítulos y cuyos juiciosos comentarios y críticas han contribuido en buena medida a la calidad pedagógica del texto final. Cada uno de los autores tiene mucho que agradecer también a los diversos colegas que les han proporcionado información y sugerencias que ayudaron a mejorar el texto. Estamos especialmente agradecidos al Dr. Greg Bertoni por su concienzuda y competente revisión de los Capítulos 9 a 12. También queremos dar las gracias a aquéllos que han contribuido a las ediciones anteriores de nuestros libros de texto, incluyendo a David Deamer, Martin Poenie, Jane Reece, John Raasch y Valerie Kish, así como Peter Armstrong, John Carson, Ed Clark, Joel Goodman, David Gunn, Jeanette Natzle, Mary Jane Niles, Timothy Ryan, Beth Schaefer, Lisa Smit, David Spiegel, Akif Uzman y Karen Valentine. Además, queremos manifestar nuestro aprecio a los muchos colegas que generosamente nos han proporcionado micrografías, así como a los autores y editores que nos han dado permiso para reproducir material de su propiedad.

Los diversos revisores han proporcionado útiles sugerencias y constructivas críticas en las varias etapas del desarrollo y revisión del manuscrito. Sus palabras de aliento y sus consejos fueron muy de agradecer. De hecho, el intenso proceso de revisión al que han sido sometidas tanto esta edición del libro como las anteriores puede considerarse como una de las características definitorias del libro. De todos modos, las responsabilidad del resultado final es nuestra, así que sólo a los autores cabe atribuir cualquier error u omisión que pueda encontrarse en las páginas de esta obra.

También estamos enormemente en deuda con los muchos profesionales del campo editorial cuyo constante aliento, cuyo duro trabajo y cuya cuidadosa atención al detalle tanto han contribuido a la calidad del texto y de los gráficos. Mención especial merecen Laura Kenney, en su papel de jefe de proyecto editorial, Jim Smith, Susan Winslow y Cinnamon Hearst de Benjamin/Cummings; así como Lisa McClanahan y sus colegas de Progressive Publishing Alternatives.

Finalmente, nuestro mayor agradecimiento a nuestras esposas, familias, estudiantes e investigadores de doctorado, sin cuya paciencia, comprensión y ayuda nunca podría haberse escrito este libro.

Revisores de la sexta edición

Katsura Asano, *Kansas State University*
William Balch, *Scripps Research Institute*
Tim Beagley, *Salt Lake Community College*
Gregory Bertoni, *Columbus State Community College*
Mark Bolyard, *Southern Illinois University, Edwardsville*
David Boone, *Portland State University*
Janet Braam, *Rice University*
Grant Brown, *University of Toronto*
David Bruck, *San Jose State University*
Patrick Bryan, *Central Washington University*
Anand Chandrasekhar, *University of Missouri*
Mitchell Chernin, *Bucknell University*
Reid Compton, *University of Maryland*
Jeff Corden, *Johns Hopkins University*
Maria Davis, *University of Alabama, Huntsville*
Arturo De Lozanne, *University of Texas, Austin*
Robert Dores, *University of Denver*
Stephen D'Surney, *University of Mississippi*
Lucinda Elliot, *Shippensburg University*
William Ettinger, *Gonzaga University*
David Featherstone, *University of Illinois, Chicago*

Swapan Ghosh, *Indiana State University*
Reid Gilmore, *University of Massachusetts*
Joseph Gindhart, *University of Massachusetts, Boston*
James Grainger, *Santa Clara University*
Rich Griner, *Augusta State University*
Karen Guzman, *Campbell University*
William Heidcamp, *Gustavus Adolphus College*
John Helmann, *Cornell University*
Chris Holford, *Purdue University*
Nancy Hopkins, *Tulane University*
Linda Huang, *University of Massachusetts, Boston*
Kenneth Jacobson, *University of North Carolina, Chapel Hill*
Makkuni Jayaram, *University of Texas, Austin*
David Kafkewitz, *Rutgers University*
Greg Kelly, *University of Western Ontario*
Kirill Kiselyov, *University of Pittsburgh*
Bruce Kohorn, *Bowdoin College*
Keith Kozminski, *University of Virginia*
Charles Lessman, *University of Memphis*
Daniel Lew, *Duke University*
Kenneth Long, *California Lutheran University*
Albert MacKrell, *Bradley University*
JoAnn Meerschaert, *St. Cloud University*
Trevor Mendelow, *University of Colorado*
John Merrill, *Michigan State University*
Teena Michael, *University of Hawaii, Manoa*
Jeffrey Miller, *University of Minnesota*
James Moroney, *Louisiana State University*
Deborah Mowhowitz, *Columbia University*
Amy Mulnix, *Earlham College*
James Mulrooney, *Central Connecticut State University*
Laura Olsen, *University of Michigan*
Donald Ott, *University of Akron*
William Plaxton, *Queens University*
Archie Portis, *University of Illinois*
Stephen Previs, *Case Western Reserve University*
Mitch Price, *Pennsylvania State University*
Tom Roberts, *Florida State University*
Gary Rudnick, *Yale University*
Joel Sheffield, *Temple University*
Brad Shuster, *New Mexico State University*
Jill Sible, *Virginia Tech*
Esther Siegfried, *Pennsylvania State University*
Michael Silverman, *California State Polytechnic University, Pomona*
Neil Simister, *Brandeis University*
Donald Slish, *Plattsburgh State University*
Roger Sloboda, *Dartmouth College*
John Sternfeld, *State University of New York, Cortland*
Scott Summers, *Colorado State University*
Brian Tague, *Wake Forest University*
Jeff Travis, *State University of New York, Albany*
Thomas Vandergon, *Pepperdine University*
James Walker, *University of Texas-Pan American*
Lauren Yaich, *University of Pittsburgh, Bradford*
Yang Yen, *South Dakota State University*
James Young, *University of Alberta*
Luwen Zhang, *University of Nebraska Lincoln*
Qiang Zhou, *University of California, Berkeley*

Revisores de las ediciones anteriores

L. Rao Ayyagari, *Lindenwood College*
Margaret Beard, *Columbia University*
William Bement, *University of Wisconsin*
Paul Benko, *Sonoma State University*
Steve Benson, *California State University, Hayward*
Joseph J. Berger, *Springfield College*
Gerald Bergtrom, *University of Wisconsin, Milwaukee*
Frank L. Binder, *Marshall University*
Robert Blystone, *Trinity University*
R. B. Boley, *University of Texas at Arlington*
Edward M. Bonder, *Rutgers, the State University of New Jersey*
James T. Bradley, *Auburn University*
Suzanne Bradshaw, *University of Cincinnati*
J. D. Brammer, *North Dakota State University*
Chris Brinegar, *San Jose State University*
Andrew Brittain, *Hawaii Pacific University*
Alan H. Brush, *University of Connecticut, Storrs*
Patrick J. Bryan, *Central Washington University*
Brower R. Burchill, *University of Kansas*
Ann B. Burgess, *University of Wisconsin, Madison*
Thomas J. Byers, *Ohio State University*
P. Samuel Campbell, *University of Alabama, Huntsville*
George L. Card, *The University of Montana*
C. H. Chen, *South Dakota State University*
Mitchell Chernin, *Bucknell University*
Edward A. Clark, *University of Washington*
Philippa Claude, *University of Wisconsin, Madison*
John M. Coffin, *Tufts University School of Medicine*
J. John Cohen, *University of Colorado Medical School*
Larry Cohen, *Pomona College*
Reid S. Compton, *University of Maryland*
Mark Condon, *Dutchess Community College*
Jonathan Copeland, *Georgia Southern University*
Bracey Dangerfield, *Salt Lake Community College*
David DeGroote, *St. Cloud State*
Douglas Dennis, *James Madison University*
Elizabeth D. Dolci, *Johnson State College*
Aris J. Domnas, *University of North Carolina, Chapel Hill*
Michael P. Donovan, *Southern Utah University*
Robert M. Dores, *University of Denver*
Diane D. Eardley, *University of California, Santa Barbara*
Guy E. Farish, *Adams State College*
James E. Forbes, *Hampton University*
Carl S. Frankel, *Pennsylvania State University, Hazleton Campus*

David R. Fromson, *California State University, Fullerton*
David M. Gardner, *Roanoke College*
Carol V. Gay, *Pennsylvania State University*
Stephen A. George, *Amherst College*
Swapan K. Ghosh, *Indiana State University*
Joseph Gindhart, *University of Massachusetts, Boston*
Michael L. Gleason, *Central Washington University*
T. T. Gleeson, *University of Colorado*
Ursula W. Goodenough, *Washington University*
Thomas A. Gorell, *Colorado State University*
Marion Greaser, *University of Wisconsin, Madison*
Karen F. Greif, *Bryn Mawr College*
Mark T. Groudine, *Fred Hutchinson Cancer Research Center, University of Washington School of Medicine*
Gary Gussin, *University of Iowa*
Leah T. Haimo, *University of California, Riverside*
Arnold Hampel, *Northern Illinois University*
Laszlo Hanzely, *Northern Illinois University*
Bettina Harrison, *University of Massachusetts, Boston*
Lawrence Hightower, *University of Connecticut, Storrs*
James P. Holland, *Indiana University, Bloomington*
Johns Hopkins III, *Washington University*
Betty A. Houck, *University of Portland*
William R. Jeffery, *University of Texas, Austin*
Kwang W. Jeon, *University of Tennessee*
Kenneth C. Jones, *California State University, Northridge*
Patricia P. Jones, *Stanford University*
Martin A. Kapper, *Central Connecticut State University*
Lon S. Kaufman, *University of Illinois, Chicago*
Steven J. Keller, *University of Cincinnati Main Campus*
Robert Koch, *California State University, Fullerton*
Joseph R. Koke, *Southwest Texas State University*
Hal Krider, *University of Connecticut, Storrs*
William B. Kristan, Jr., *University of California, San Diego*
David N. Kristie, *Acadia University (Nova Scotia)*
Frederic Kundig, *Towson State University*
Dale W. Laird, *University of Western Ontario (London, Ontario, Canada)*
Elias Lazarides, *California Institute of Technology*
Esther M. Leise, *University of North Carolina, Greensboro*
John T. Lis, *Cornell University*
Robert Macey, *University of California, Berkeley*
Roderick MacLeod, *University of Illinois, Urbana-Champaign*
Shyamal K. Majumdar, *Lafayette College*
Gary G. Matthews, *State University of New York, Stony Brook*
Douglas McAbee, *California State University, Long Beach*
Thomas D. McKnight, *Texas A & M University*
Robert L. Metzenberg, *University of Wisconsin, Madison*
Hugh A. Miller III, *East Tennessee State University*
Tony K. Morris, *Fairmont State College*
Deborah B. Mowshowitz, *Columbia University*
Carl E. Nordahl, *University of Nebraska, Omaha*
Richard Nuccitelli, *University of California, Davis*
Donata Oertel, *University of Wisconsin, Madison*
Joanna Olmsted, *University of Rochester*
Alan Orr, *University of Northern Iowa*
Curtis L. Parker, *Morehouse School of Medicine*
Lee D. Peachey, *University of Colorado*
Debra Pearce, *Northern Kentucky University*
Howard Petty, *Wayne State University*
Susan Pierce, *Northwestern University*
Joel B. Piperberg, *Millersville University*
Gilbert C. Pogany, *Northern Arizona University*
Ralph Quatrano, *Oregon State University*
Ralph E. Reiner, *College of the Redwoods*
Gary Reiness, *Lewis and Clark College*
Douglas Rhoads, *University of Arkansas*
Michael Robinson, *North Dakota State University*
Adrian Rodriguez, *San Jose State University*
Donald J. Roufa, *Kansas State University*
Donald H. Roush, *University of North Alabama*
Edmund Samuel, *Southern Connecticut State University*
Mary Jane Saunders, *University of South Florida*
John I. Scheide, *Central Michigan University*
Mary Schwanke, *University of Maine, Farmington*
David W. Scupham, *Valparaiso University*
Edna Seaman, *University of Massachusetts, Boston*
Diane C. Shakes, *University of Houston*
Sheldon S. Shen, *Iowa State University*
Randall D. Shortridge, *State University of New York, Buffalo*
Dwayne D. Simmons, *University of California, Los Angeles*
Robert D. Simoni, *Stanford University*
William R. Sistrom, *University of Oregon*
Donald Slish, *Plattsburgh State College*
Robert H. Smith, *Skyline College*
Mark Staves, *Grand Valley State University*
Barbara Y. Stewart, *Swarthmore College*
Bradley J. Stith, *University of Colorado, Denver*
Richard D. Storey, *Colorado College*
Antony O. Stretton, *University of Wisconsin, Madison*
Philip Stukus, *Denison University*
Stephen Subtelny, *Rice University*
Millard Susman, *University of Wisconsin, Madison*
Elizabeth J. Taparowsky, *Purdue University*
Barbara J. Taylor, *Oregon State University*
Bruce R. Telzer, *Pomona College*
John J. Tyson, *Virginia Polytechnic University*
Akif Uzman, *University of Texas, Austin*
Quinn Vega, *Montclair State University*
Fred D. Warner, *Syracuse University*
James Watrous, *St. Joseph's University*
Fred H. Wilt, *University Of California, Berkeley*
James Wise, *Hampton University*
David Worcester, *University of Missouri, Columbia*
Linda Yasui, *Northern Illinois University*

1

Una visión de la célula

La **célula** es la unidad básica en biología. Cada organismo o bien es una única célula o está formado por células. Por lo tanto, únicamente podremos apreciar las capacidades y las limitaciones de los organismos vivos, tanto animales como vegetales o microorganismos, si comprendemos la estructura y la función de las células.

Estamos en medio de una revolución de la biología que ha traído consigo tremendos avances en el entendimiento de cómo están construidas las células y de cómo realizan las complicadas funciones necesarias para la vida. La naturaleza dinámica de la célula es particularmente significativa, como se pone de manifiesto por su capacidad de crecer, reproducirse y especializarse, y por su habilidad para responder a estímulos y adaptarse a cambios en el medio ambiente.

La propia biología celular está cambiando al tiempo que científicos de diversas disciplinas relacionadas dirigen sus esfuerzos hacia el objetivo común de la adecuada compresión de cómo funcionan las células. La convergencia de la citología, la genética y la bioquímica ha hecho de la biología celular moderna una de las disciplinas más excitantes y dinámicas de la biología contemporánea.

En este capítulo trataremos brevemente los principios de la biología celular como disciplina. Luego consideraremos las tres corrientes principales que han dado lugar a la comprensión actual de lo que son las células y de cómo funcionan.

La teoría celular: una historia breve

La historia de la biología celular comenzó hace más de 300 años cuando algunos científicos europeos comenzaron a enfocar sus microscopios a diversos materiales biológicos, desde la corteza de los árboles hasta el esperma humano. Uno de esos científicos fue Robert Hooke, conservador de instrumentos de la *Royal Society* de Londres. En 1965, Hooke empleó un microscopio construido por él mismo para examinar secciones finas de corcho cortadas con un cortaplumas. Observó una red de pequeños compartimentos en forma de caja que le recordaron a un panal. Hooke denominó a esos pequeños compartimentos *cellulae* un término del latín que significa «pequeñas habitaciones». El término actual de célula procede de esta palabra.

En realidad, lo que Hooke observó no eran células sino las paredes celulares vacías de un tejido vegetal muerto, que es lo que realmente es la corteza de los árboles. Sin embargo, Hooke no pensó en sus *cellulae* como estructuras muertas ya que él no entendía que pudiesen estar vivas. Aunque se dio cuenta de que las células en otros tejidos vegetales estaban llenas de lo que el llamó «jugos», prefirió concentrarse en las prominentes paredes celulares que había encontrado inicialmente.

Una de las limitaciones inherentes a las observaciones de Hooke consiste en que su microscopio aumentaba únicamente 30 veces los objetos, lo cual dificulta el aprendizaje de la organización interna de las células. Este obstáculo fue superado unos años más tarde por Antonie van Leeuwenhoek, un comerciante holandés que dedicó gran parte de su tiempo libre a diseñar microscopios. Van Leeuwenhoek fabricó lentes pulidas a mano que podían magnificar los objetos casi 300 veces. Utilizando estas lentes más potentes, fue el primero en observar células vivas, incluyendo células sanguíneas, espermatozoides y organismos unicelulares presentes en el agua de las charcas. Comunicó sus observaciones a la *Royal Society* en una serie de artículos durante el último cuarto del siglo XVII. Sus descripciones detalladas

Anexo 1A

Unidades de medida en biología celular

El desafío de la comprensión de la estructura y organización celular se complica por el problema del tamaño. La mayoría de las células y sus orgánulos son tan pequeños que no pueden ser observados directamente por el ojo humano. Además, las unidades empleadas para medirlos son poco familiares para muchos estudiantes y, por lo tanto, a menudo son difíciles de apreciar. El problema puede abordarse de dos maneras: Conociendo que realmente sólo hay dos unidades útiles para expresar la dimensión de la mayoría de estructuras que nos interesan y mediante la ilustración de diversas estructuras que pueden ser medidas apropiadamente con cada una de esas unidades. El **micrómetro** (μm) es la unidad más útil para expresar el tamaño de las células y de los orgánulos más grandes. 1 μm (algunas veces también llamado *micra*)

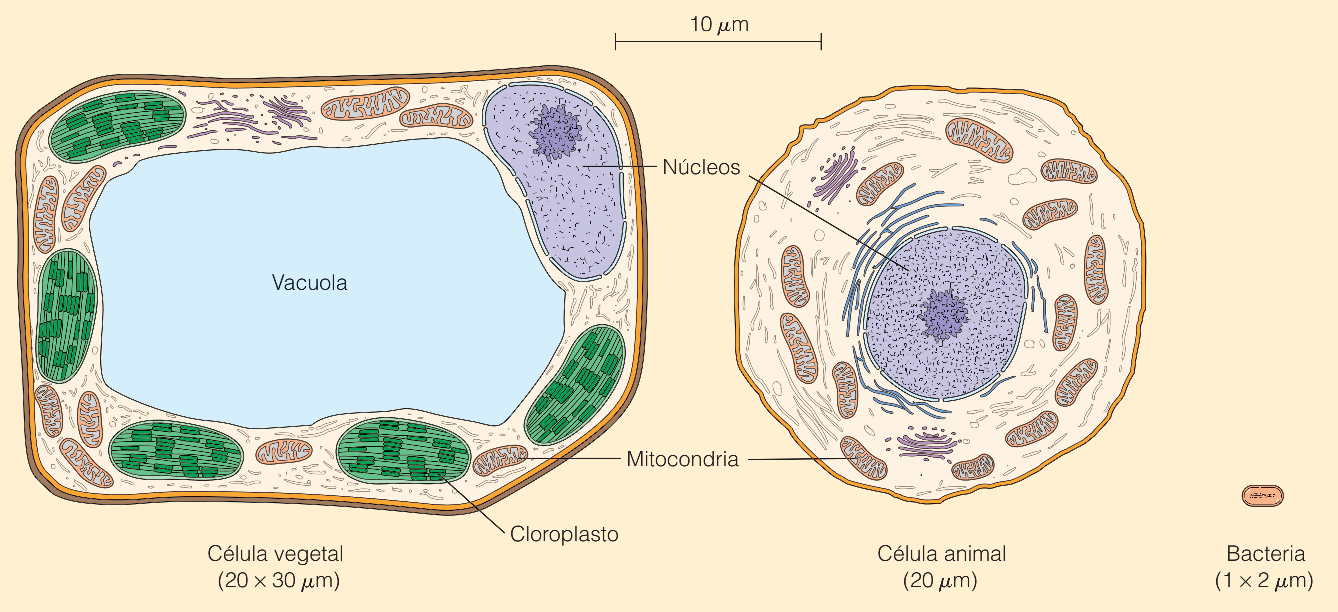


Figura 1A.1 El mundo del micrómetro. Casi todas las células y algunos de sus orgánulos más grandes, como el núcleo, mitocondrias y cloroplastos son estructuras con dimensiones que pueden medirse convenientemente en micrómetros.

dan testimonio de la calidad de sus lentes y de su profunda capacidad de observación.

Dos factores restringieron la comprensión de la naturaleza de las células. Uno fue la resolución de los microscopios de la época, que era limitada incluso en los mejores instrumentos de van Leeuwenhoek. El segundo factor, probablemente más fundamental, fue la naturaleza esencialmente descriptiva de la biología del siglo XVII. Ésta fue básicamente una época de observación en la que se dedicó poco esfuerzo a pensar en explicar los intrigantes detalles estructurales de los materiales biológicos, que estaban empezando a residir en la capacidad de las lentes del microscopio.

Pasó más de un siglo antes de que la combinación de microscopistas con mentes más experimentales, junto con las mejoras de los microscopios, dieran lugar a una serie de avances que culminaron en el entendimiento de la importancia de las células en la organización biológica. En la década de 1930, las mejoras en las lentes condujeron a una mayor capacidad de aumento y a una mejor resolución, de forma que se pudieron distinguir estructuras separadas únicamente por 1 micrometro (μm). (Un *micrómetro* es igual a 10^{-6} m, o a la millonésima parte de un metro; *véase* Anexo 1A para una discusión de las unidades de medida apropiadas en biología celular.)

El botánico inglés Robert Brown, ayudado por la mejora de las lentes, descubrió que cada planta que observaba contenía una estructura redondeada a la que él llamó *nucleus*, un término latino derivado del germánico «kernel: grano». En 1838, su colega alemán Matthias Schleiden alcanzó la importante conclusión de que todos los tejidos vegetales están compuestos por células y de que un embrión vegetal se origina siempre a partir de una única célula. Sólo un año más tarde Theodor Schwann comunicó conclusiones semejantes respecto a los tejidos animales, desechándose así las especulaciones anteriores de que las plantas y los animales no se parecen estructuralmente. Es fácil comprender cómo se pudieron originar esas especulaciones.

corresponde a la millonésima parte de 1 m. En general las células bacterianas tienen un diámetro de pocos micrómetros, y las células animales y vegetales son de 10 a 20 veces más grandes en cualquiera de sus dimensiones. Los orgánulos como mitocondrias y cloroplastos tienden a tener diámetros o longitudes de unos pocos micrómetros y son por lo tanto comparables en tamaño a las células bacterianas completas. Los orgánulos más pequeños están habitualmente en el rango de 0,2-1 μm. Como regla general, si algo se puede ver con un microscopio óptico, sus dimensiones pueden expresarse probablemente en micrómetros, ya que el límite de resolución del microscopio óptico es alrededor de 0,2-0,35 μm. La Figura 1A.1 ilustra diversas estructuras que usualmente se miden en micrómetros.

El **nanómetro** (nm), por otro lado es la unidad que se emplea para moléculas y estructuras subcelulares que son demasiado pequeñas o demasiado delgadas para ser observadas con un microscopio óptico. 1 nanómetro es una billonésima parte de 1 m (10^{-9}). 1 micrómetro es igual a 1.000 nanómetros. (Un término alternativo a nanómetro es por lo tanto *milimicra,* mμ). Como referencia en la escala de los nanómetros un ribosoma tiene un diámetro de unos 25-30 nm. Otras estructuras que pueden ser medidas en nanómetros son los microtúbulos, microfilamentos, membranas y moléculas de DNA. En la Figura 1A.2 se indican las dimensiones de estas estructuras.

Otra unidad usada frecuentemente en biología celular es el **ángstrom** (Å) que corresponde a 0,1 nm. En particular, las dimensiones moleculares se expresan frecuentemente en ángstrom. Sin embargo, debido a que el ángstrom se diferencia del nanómetro solamente por un factor de 10, añade poca flexibilidad para expresión de dimensiones a nivel celular y por lo tanto no será empleado en este texto.

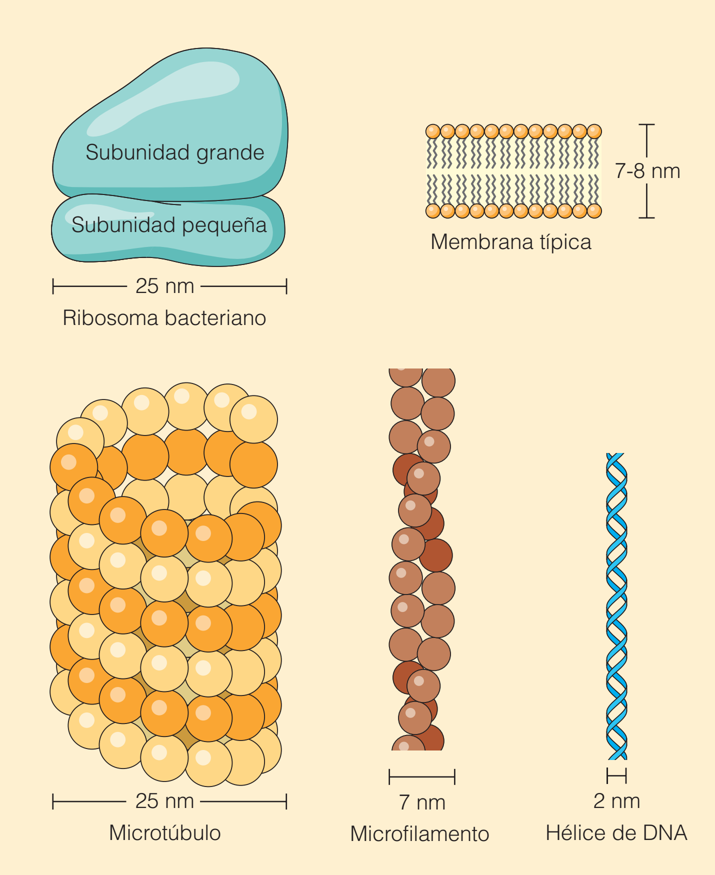


Figura 1A.2 El mundo del nanómetro. Los ribosomas, membranas, microtúbulos, microfilamentos y la doble hélice de DNA son estructuras con dimensiones que se pueden medir convenientemente en nanómetros.

Después de todo, las paredes de las células vegetales constituyen barreras entre las células que son visibles incluso con un microscopio ordinario, mientras que las células animales, que carecen de pared celular, son mucho más difíciles de distinguir en una muestra de tejido. Únicamente cuando Schwann examinó células de cartílago se convenció de las similitudes fundamentales entre los tejidos animales y vegetales, ya que las células del cartílago, al contrario que la mayoría de las células animales, tienen límites bien establecidos por depósitos gruesos de fibras de colágeno. Schwann reunió todas estas observaciones en una teoría unificada de la organización celular, que se ha mantenido ante la prueba del tiempo y que continúa siendo la base de nuestro entendimiento de la importancia de las células y de la biología celular.

La **teoría celular** tal y como fue originariamente postulada por Schwann tiene dos principios importantes:

1. Todos los organismos consisten en una o más células.
2. La célula es la unidad básica de la estructura de todos los organismos.

Menos de 20 años después se añadió un tercer principio. Éste se generó a partir de la descripción original de Brown de los núcleos, suplementada por Kart Nägeli para incluir sus observaciones sobre la naturaleza de la división celular. Hacia 1855, el fisiólogo alemán Rudolf Virchow concluyó que las células se generan únicamente mediante la división de otras células preexistentes. Virchow describió esta conclusión en la ahora famosa frase del latín *omnis cellula e cellula,* cuya traducción se convierte en el tercer principio de la teoría celular moderna:

3. Todas las células se originan únicamente a partir de células preexistentes.

Así, la célula no es sólo la unidad básica de la estructura de todos los organismos sino también la unidad básica de reproducción. En otras palabras, todas las formas de vida tienen una base celular. Entonces, no resulta sorpren-

dente que el entendimiento de las células y de sus propiedades sea tan fundamental para la apreciación correcta de otros aspectos de la biología.

La emergencia de la teoría celular moderna

La teoría celular moderna implica el entretejido de tres hebras o ramas diferentes en una única cuerda. Como ilustra la Figura 1.1, cada una de estas ramas tiene orígenes históricos diferentes, y la mayor parte de su entrelazamiento se ha producido únicamente en los últimos 75 años. Cada rama debe ser apreciada independientemente de que cada una aporta una contribución independiente y significativa. Los biólogos celulares contemporáneos deben conocer adecuadamente cada una de las ramas, independientemente de sus intereses inmediatos.

La primera de esas ramas históricas es la **citología**, que principalmente se preocupa de la estructura celular. (El prefijo griego *cyto*-, al igual que el sufijo -*cito* significa célula). Como ya hemos visto, la citología tiene sus orígenes hace más de 300 años y su desarrollo inicial dependió en gran medida de la microscopía óptica. La incorporación de la microscopía electrónica y de diversas técnicas ópticas relacionadas con ésta ha conducido a un considerable incremento de la actividad y el entendimiento de la citolología.

Las contribuciones de la **bioquímica** a nuestro entendimiento de la función celular representa la segunda rama. La mayor parte de los avances en este campo se han producido en los últimos 75 años, aunque de nuevo, sus orígenes retroceden mucho más en el tiempo. El desarrollo de técnicas como la ultracentrifugación, la cromatografía y la electroforesis, ha sido especialmente importante para la separación de los componentes celulares y moleculares. La utilización de compuestos marcados radioactivamente en el estudio de reacciones catalizadas enzimáticamente y de rutas metabólicas ha supuesto otra contribución muy significativa de la bioquímica a nuestro entendimiento de cómo funcionan las células. En capítulos sucesivos detallaremos éstas y otras técnicas relevantes cuando su entendimiento sea necesario para explorar diversos aspectos de la estructura y función celular. Véase la Guía de Técnicas y Métodos adjunta para localizar discusiones sobre técnicas específicas.

La tercera rama es la **genética**. Su recorrido histórico retrocede más de 150 años hasta Gregor Mendel. Sin embargo, de nuevo gran parte de nuestro entendimiento actual de la genética ha surgido durante los últimos 75 años. La demostración de que el DNA (ácido desoxiribonucleico) es el portador de la información genética en la mayor parte de las formas de vida, y especifica el orden de subunidades, y de ahí las propiedades de las proteínas responsables de la mayoría de las características funcionales y estructurales de las células, constituyó un hito especialmente importante en la rama de la genética.

Los logros recientes en la rama de la genética incluyen la secuenciación de los *genomas* íntegros (todo el DNA) del hombre y de otras especies y el *clonaje* (producción de organismos idénticos genéticamente) de mamíferos incluidos ovejas y gatos.

El entendimiento de la biología celular actual supone, por lo tanto, la apreciación de sus diversas raíces y de la importancia de las contribuciones que cada una de las corrientes que la componen han realizado para nuestro entendimiento de lo que una célula es y de lo que puede hacer. A continuación se discute de manera breve cada una de las corrientes históricas de la biología celular si bien obtendremos una apreciación más completa cuando exploremos diversos aspectos de la estructura, la función y la genética celular en otros capítulos.

La rama de la citología estudia la estructura celular

Hablando estrictamente, la citología es el estudio de las células (de hecho, el significado literal de la palabra griega *cytos* «recipiente hueco», encaja bien con la impresión inicial de Hooke de las células). Sin embargo, históricamente la citología se ha ocupado principalmente de estructura celular, fundamentalmente a través del uso de técnicas ópticas. Aquí se describen brevemente algunos aspectos de la microscopía que han sido importantes en biología celular. Véase el apéndice para una discusión más detallada.

El microscopio óptico. El **microscopio óptico** fue la primera herramienta de los citólogos y continúa teniendo un papel fundamental en nuestra elucidación de la estructura celular. La microscopía óptica posibilitó a los citólogos la identificación de estructuras rodeadas por membranas como *núcleos, mitocondrias* y *cloroplastos* en diversos de tipos celulares. Estas estructuras se denominan orgánulos («pequeños órganos») y su presencia es una característica prominente de la mayor parte de células animales y vegetales (pero no de bacterias).

Otros avances significativos incluyen la invención del micrótomo en 1870 y la disponibilidad, más o menos al mismo tiempo, de diversos tintes y colorantes. Un *micrótomo* es un instrumento que permite obtener secciones finas a partir de muestras biológicas, normalmente después de que éstas han sido deshidratadas e incluidas en parafina o plástico. La técnica posibilita la preparación rápida y eficiente de secciones finas de tejido de un grosor uniforme. Los colorantes, que han desempeñado un papel tan importante en la tinción y la identificación de estructuras subcelulares, fueron desarrollados principalmente en la segunda mitad del siglo XIX por químicos industriales alemanes trabajando con derivados del alquitrán.

Éstos y otros avances relacionados, junto con la mejora de la óptica y la generación de lentes más sofisticadas, condujeron a la microscopía óptica tan lejos como podía ir,

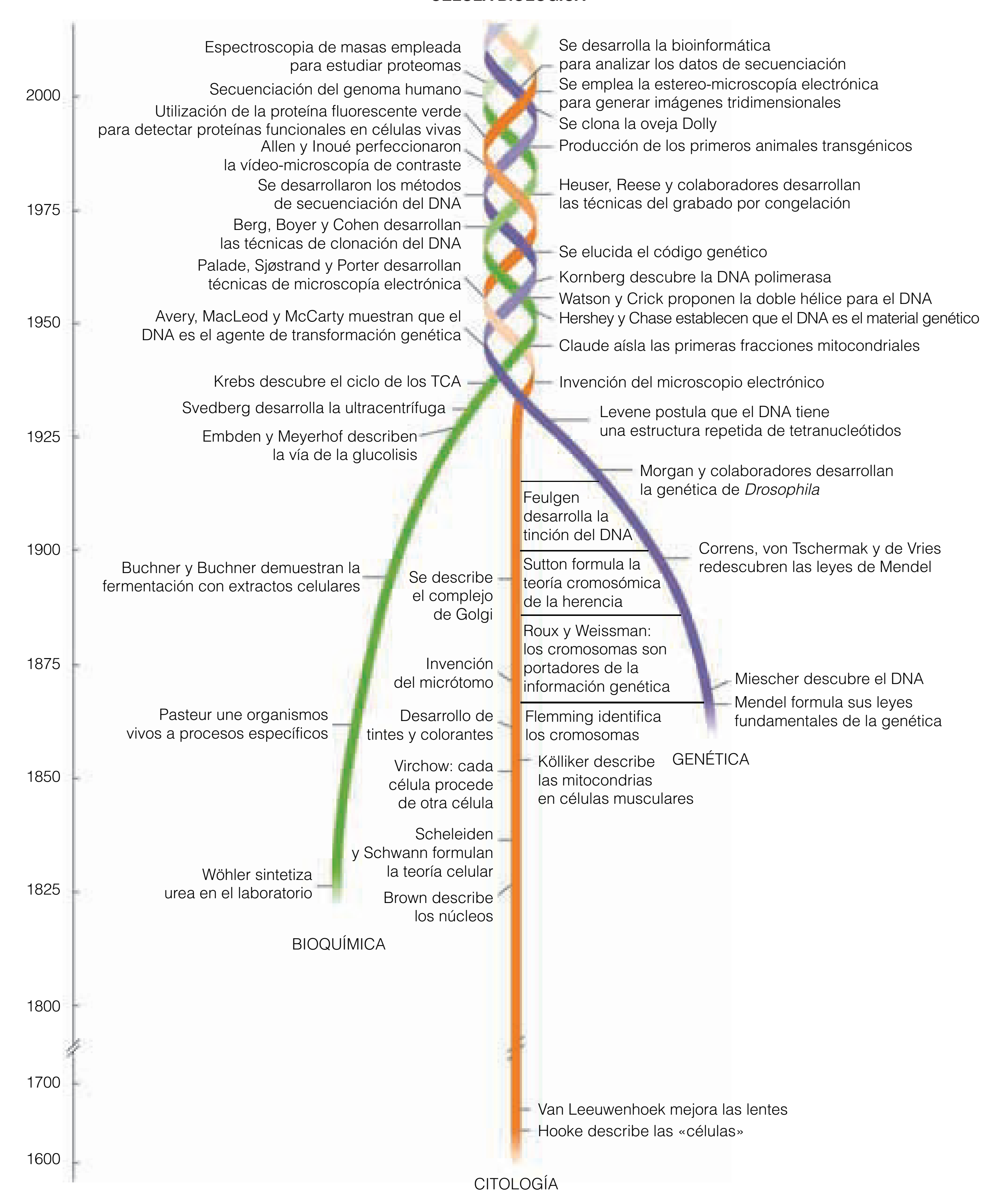


Figura 1.1 **La línea del tiempo en biología celular.** Aunque la citología, la bioquímica y la genética comenzaron como disciplinas separadas, se han ido uniendo progresivamente desde el segundo cuarto del siglo XX.

hasta los límites de la resolución determinados por la longitud de onda de la luz visible. Tal y como se emplea en microscopía, el **límite de resolución** hace referencia a cómo de separados tienen que estar los objetos adyacentes para ser distinguidos como entidades separadas. Por ejemplo, afirmar que el límite de resolución de un microscopio es de 400 nanómetros (nm) significa que los objetos necesitan estar separados al menos 400 nm para ser reconocidos como entidades separadas, mientras que una resolución de 200 nm significa que se pueden distinguir objetos separados tan sólo por 200 nm (un *nanómetro* es 10^{-9} metros; 1 nm = 0,001 μm). Cuanto más pequeño es el límite de resolución de un microscopio, mayor es su **poder de resolución**. Expresado en términos de λ, la longitud de onda de la luz usada para iluminar la muestra, el límite de resolución teórico para el microscopio óptico es de $\lambda/2$. El límite de resolución para la luz visible, en un rango de longitudes de onda de 400-700 nm, es de alrededor de 200-300 nm. La Figura 1.2 ilustra el rango útil del microscopio óptico y compara su poder de resolución con el del ojo humano y el del microscopio electrónico.

Visualización de células vivas. El tipo de microscopía descrito hasta ahora se denomina *microscopía de campo claro*, porque la luz blanca pasa directamente a través de la muestra, la cual puede estar teñida o no, dependiendo de las características estructurales que vayamos a examinar. Una limitación significativa de esta aproximación es que las muestras deben estar fijadas (preservadas), deshidratadas, e incluidas en parafina o en plástico. La muestra por lo tanto no estará viva, lo que conlleva la posibilidad de que algunas de las características observadas con este método, puedan ser artefactos o distorsiones debidas al proceso de fijación, deshidratación o de inclusión. Para solventar esta desventaja, se han desarrollado diversas técnicas ópticas especiales que hacen posible observar directamente células vivas. Entre éstas, se incluyen la microscopía de contraste de fase, la microscopía de contraste de interferencia diferencial la microscopía de fluorescencia, la microscopía confocal y la videomicroscopía digital. La Tabla 1.1 muestra imágenes observadas con cada una de esas técnicas y las compara con imágenes observables con microscopía de campo claro para muestras teñidas y sin teñir. Cada una de estas técnicas se discutirá en el apéndice; en este momento nos conformaremos con una breve descripción de cada una de ellas.

La *microscopía de contraste de fase* y de *contraste de interferencia diferencial* hacen posible observar claramente células vivas (*véase* Tabla 1.1). Estas dos técnicas incrementan y amplifican los pequeños cambios de fase de la luz trasmitida, cuando ésta atraviesa una estructura que tiene distinto índice de refracción que el medio que la rodea. La mayoría de los microscopios ópticos actuales, además de la simple transmisión de luz, están equipados con contraste de fase y contraste de interferencia diferencial, de forma

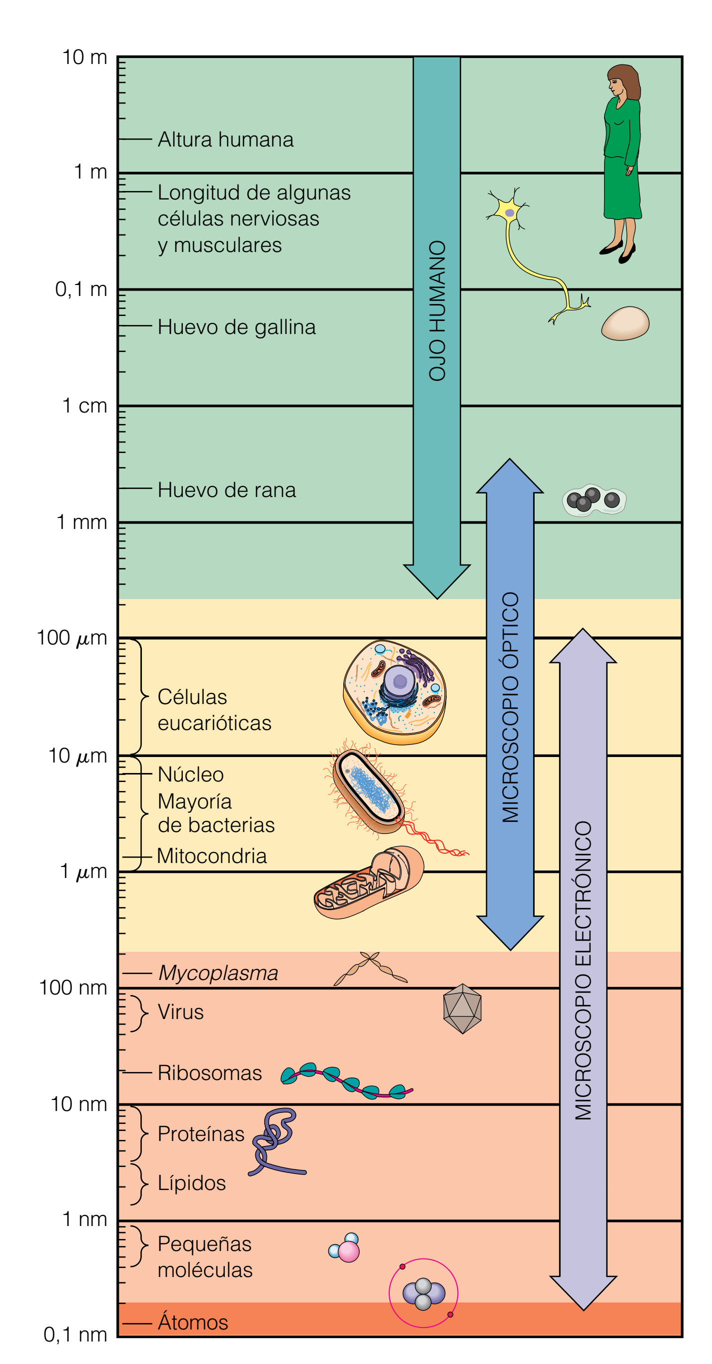
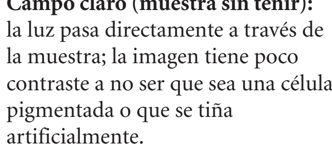
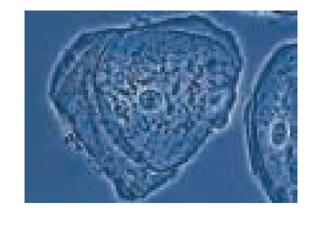
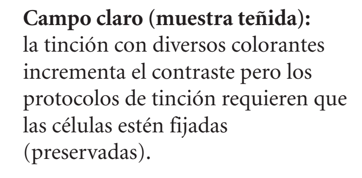
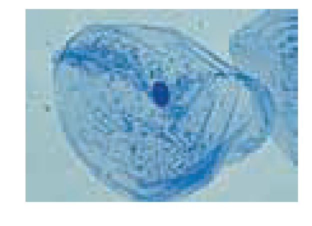
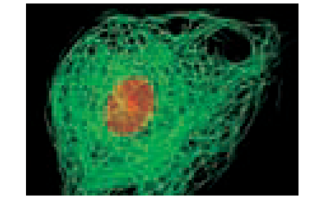
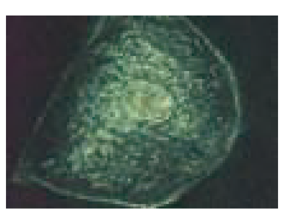


Figura 1.2 Microscopía electrónica de barrido. Se utilizó un microscopio electrónico de barrido para visualizar células de neuroblastoma humano (a) y un grano de polen (b).

que se puede cambiar de un modo de uso a otro intercambiando componentes ópticos.

La *microscopía de fluorescencia* posibilita a los investigadores detectar proteínas específicas u otras moléculas al hacerlas fluorescentes mediante el acoplamiento de un colorante fluorescente. Se puede estudiar la distribución de diferentes tipos de moléculas en la misma célula mediante el uso simultáneo de dos o más de estos colorantes, cada uno acoplado a un tipo de molécula.

Tabla 1.1 **Comparación entre distintos tipos de microscopía óptica**

Tipo de microscopía	Microfotografías ópticas de células epiteliales humanas de la mucosa oral		Tipo de microscopía
 **Campo claro (muestra sin teñir):** la luz pasa directamente a través de la muestra; la imagen tiene poco contraste a no ser que sea una célula pigmentada o que se tiña artificialmente.			**Contraste de fase:** incrementa el contraste de las células sin teñir amplificando las variaciones en el índice de refracción dentro de la muestra; es especialmente útil para examinar células vivas sin pigmentación.
 **Campo claro (muestra teñida):** la tinción con diversos colorantes incrementa el contraste pero los protocolos de tinción requieren que las células estén fijadas (preservadas).			**Contraste de interferencia diferencial:** emplea también modificaciones ópticas para exagerar las diferencias de los índices de refracción.
Fluorescencia: muestra la localización de moléculas específicas en la célula. Las sustancias fluorescentes absorben radiación ultravioleta y emiten luz visible. Las moléculas fluorescentes pueden existir de manera natural en la muestra, pero a menudo se generan uniendo colorantes o anticuerpos fluorescentes a las moléculas de interés.		 50 μm	**Confocal:** emplea luz láser y un sistema óptico especial para iluminar un único plano dentro de la muestra. Se obtienen imágenes únicamente de las regiones contenidas en una profundidad de foco estrecha. Las regiones por encima y por debajo del plano de visión seleccionado aparecen en negro y no desenfocadas.

Fuente: tomado de Campbell y Reece, *Biología*, sexta edición (San Francisco: Benjamín Cummings, 2002), p. 110

Una limitación inherente a la microscopía de fluorescencia es que el observador únicamente puede enfocar un plano de la muestra en un momento determinado, aunque todo el espesor de la muestra emita luz fluorescente. Como consecuencia, la imagen visible es borrosa por la luz emitida desde regiones de la muestra por encima y por debajo del plano de foco, lo que históricamente limitó esta técnica al estudio de células aplanadas con un espesor mínimo. Este problema se ha solucionado en gran medida mediante la *microscopía confocal* en la que se emplea un haz de luz láser para iluminar en un momento determinado un único plano de la muestra. Esta aproximación confiere mucha mejor resolución que la microscopía de fluorescencia tradicional, cuando se emplea en muestras gruesas como células completas. Además, el haz de luz láser se puede dirigir secuencialmente a planos de foco sucesivos generando de esta forma series de imágenes que se pueden combinar para obtener una imagen tridimensional de la célula.

Otro avance reciente en microscopía óptica es la *videomicroscopía* digital, que emplea cámaras de vídeo y almacenamiento informático, y permite el procesamiento de imágenes digitalizadas para optimizar y analizar imágenes. El acoplamiento de cámaras de vídeo de alta sensibilidad lumínica a los microscopios, hace posible la observación de células durante periodos prolongados de tiempo, usando niveles muy bajos de iluminación. Esta *intensificación de la imagen* es particularmente útil para la visualización de moléculas fluorescentes en células vivas con un microscopio de fluorescencia.

El microscopio electrónico. A pesar de los avances en las técnicas ópticas y en el incremento en el contraste, la microscopía óptica está limitada inevitablemente por el límite de resolución, determinado por la longitud de onda de la luz empleada para la visualización de la muestra. Incluso la utilización de radiación ultravioleta, con longitudes de onda más cortas, incrementan la resolución únicamente por un factor de uno o dos.

El desarrollo del **microscopio electrónico**, inventado en Alemania en 1932 y cuya utilización en estudios de biología se extendió a principios de la década de los años 50, trajo consigo un adelanto decisivo en el poder de resolución. En lugar de luz visible y lentes ópticas, el microscopio electrónico emplea un haz de electrones que es desviado y enfocado por un campo electromagnético. Debido a que la longitud de onda de los electrones es mucho más corta que la de los fotones de la luz visible, el límite de resolución del microscopio electrónico es mucho mejor que el del mi-

croscopio óptico: alrededor de 0,1-0,2 nm para el microscopio electrónico en comparación con 200-350 nm para el microscopio óptico.

Pese a todo, el límite de resolución práctico para muestras biológicas normalmente no es mejor de 2 nm, debido a problemas de contraste y de preparación de la muestra. Sin embargo, el microscopio electrónico tiene alrededor de 100 veces más poder de resolución que el microscopio óptico (*véase* Figura 1.2). Como resultado, la capacidad útil de aumentar es también mayor: hasta 100.000 veces para el microscopio electrónico, comparado con 1.000-1.500 veces para el microscopio óptico.

Existen dos diseños básicos de microscopio electrónico: el **microscopio electrónico de transmisión** (**TEM**) y el **microscopio electrónico de barrido** (**SEM**). Los dos se describen detalladamente en el apéndice. Los microscopios electrónicos de transmisión y de barrido son similares, ya que ambos emplean un haz de electrones, pero usan mecanismos diferentes para la formación de la imagen. Como su nombre implica, el TEM forma la imagen a partir de electrones que se transmiten a través de la muestra. En cambio, el SEM escanea la superficie de la muestra y forma una imagen por a partir de los electrones desviados de la superficie externa de la muestra. La microscopía electrónica de barrido es una técnica especialmente espectacular por la sensación de profundidad que da a las muestras biológicas (Figura 1.3). La mayor parte de las micrografías electrónicas de este libro han sido obtenidas mediante la utilización del TEM o el SEM y se identifican al final de cada pie de figura mediante la abreviatura de tres letras.

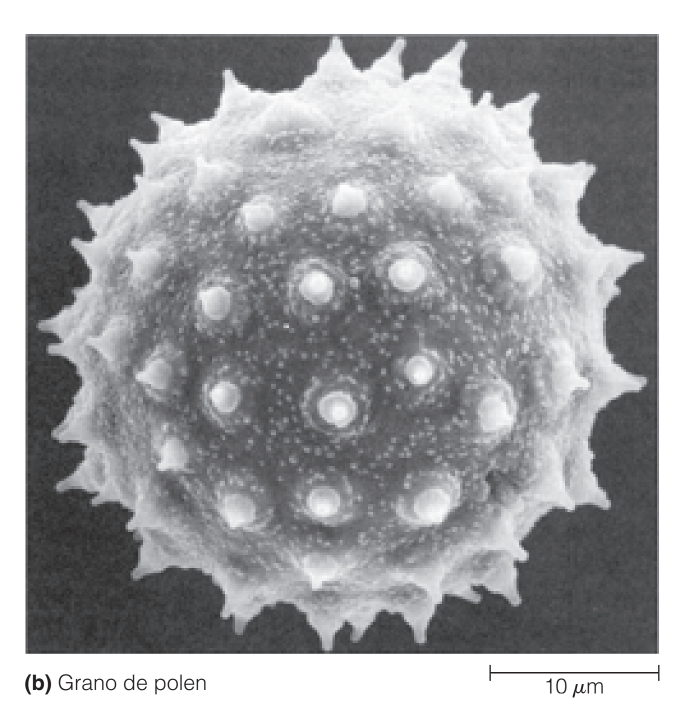
Las muestras que se preparan para microscopía electrónica deben ser extremadamente finas debido al bajo poder de penetración de los electrones. El instrumento que se emplea para este fin se denomina *ultramicrótomo*. Está equipado con una cuchilla de diamante y puede cortar secciones tan finas como 20 nm. También se pueden estudiar muestras sustancialmente más gruesas mediante microscopía electrónica pero entonces es necesario un mayor voltaje para incrementar adecuadamente el poder de penetración de los electrones. Estos *microscopios electrónicos de alto voltaje* usan voltajes de aceleración de hasta varios miles de kilovoltios (kV), comparados con el rango de 50-100 kV comúnmente empleado en la mayoría de los instrumentos convencionales. Con el instrumento de alto voltaje se pueden estudiar secciones de hasta 1 μm de grosor y esto nos permite examinar en mayor profundidad orgánulos y otras estructuras celulares.

Actualmente se emplean diversas técnicas especializadas de microscopía electrónica de transmisión, para las cuales se preparan las muestras de forma alternativa. Entre ellas se incluyen la *tinción negativa*, *el sombreado, la criofractura y el grabado por congelación,* las cuales permiten la visualización de muestras en tres dimensiones. La técnica denominada *estereo-microscopía electrónica* es una técnica adecuada para este propósito y en ella la muestra es fotografiada desde dos ángulos ligeramente diferentes usando un soporte que puede ser inclinado con respecto al haz de electrones. Estas técnicas se describen en detalle en el apéndice.

La microscopía electrónica ha revolucionado nuestro entendimiento de la arquitectura celular haciendo posible



(a) Células de neuroblastoma humano 50 μm



(b) Grano de polen 10 μm

Figura 1.3 Microscopía electrónica de barrido. Se utilizó un microscopio electrónico de barrido para visualizar células de neuroblastoma humano (a) y un grano de polen (b).

investigaciones ultraestructurales detalladas. Algunos orgánulos (como los núcleos o las mitocondrias) son suficientemente grandes para ser observados con un microscopio óptico pero pueden ser estudiados con mucho más detalle con un microscopio electrónico. Además, la microscopía electrónica ha puesto de manifiesto la existencia de estructuras celulares que son demasiado pequeñas para ser observadas a microscopía óptica. Éstas incluyen ribosomas, membranas, microtúbulos y microfilamentos (*véase* Figura 1A.2 en página 3).

La bioquímica estudia la química de la estructura y la función biológica

En el momento en el que los citólogos estaban comenzando a explorar la estructura celular con sus microscopios, otros científicos estaban haciendo observaciones que comenzaron a explicar y a clarificar la función celular. Gran parte de lo que ahora se denomina bioquímica procede de un descubrimiento descrito por el químico alemán Friedrich Wöhler en 1828. Wöhler fue contemporáneo (así como compatriota) de Schleiden y Schwann. Él revolucionó nuestro pensamiento acerca de la biología y la química mediante la demostración de que la urea, un compuesto orgánico de origen biológico, podría ser sintetizada en el laboratorio partiendo de un material inorgánico como el cianato de amonio. Hasta entonces, se había mantenido que los organismos vivos constituían un mundo aislado, no gobernado por las leyes de la química y de la física, que rigen el mundo inerte. Mediante la demostración de que un compuesto hecho por organismos vivos —«bioquímico»— podría ser sintetizado en un laboratorio igual que otros compuestos químicos, Wöhler ayudó a romper la distinción conceptual entre los mundos vivo e inerte y a disipar la noción de que los procesos bioquímicos estaban de alguna forma exentos de las leyes de la química y la física.

Otro gran avance vino 40 años más tarde, cuando Louis Pasteur unió la actividad de los organismos vivos a procesos específicos, mostrando que para llevar a cabo la fermentación del azúcar en alcohol eran necesarias levaduras vivas. Esta observación fue seguida en 1897 por el descubrimiento de Eduard y Hans Buchner de que la fermentación podía tener lugar también a partir extractos de levaduras, es decir, las células intactas no eran necesarias. Inicialmente, estos extractos se denominaron «fermentos», pero gradualmente se fue clarificando que los agentes activos en los extractos eran catalizadores biológicos específicos que desde entonces se han denominado **enzimas**.

En las décadas de 1920 y 1930 se produjo un progreso significativo en nuestro entendimiento de la función celular al elucidar las vías bioquímicas de la fermentación y otros procesos celulares relacionados. Este periodo estuvo dominado por los bioquímicos alemanes como Gustav Embden, Otto Meyerhof, Otto Warburg y Hans Krebs. Algunos de ellos han quedado inmortalizados desde entonces por las vías metabólicas que llevan sus nombres. Por ejemplo, la *vía Embden-Meyerhof* de la glucolisis supuso un gran triunfo de la investigación de los principios de los años 30. Poco después fue seguido por el *ciclo de Krebs* (también conocido como el ciclo de los TCA). Estas dos vías son importantes por su implicación en el proceso mediante el cual las células obtienen energía a partir de sus nutrientes. Aproximadamente al mismo tiempo, Fritz Lipmann, un bioquímico americano, describió que el compuesto de alta energía *adenosina trifosfato (ATP)* es el principal compuesto de almacenamiento de energía en la mayoría de las células.

Cuando se empezaron a usar isótopos radioactivos como ^{3}H, ^{14}C o ^{32}P para marcar el destino de átomos y moléculas específicas se produjo un avance importante en el estudio de las reacciones y las vías bioquímicas. (Como podrá recordar de la química, distintos átomos de un elemento pueden tener el mismo número atómico y casi propiedades idénticas pero diferir en el número de neutrones y, por lo tanto, en el peso atómico; un *isótopo* se refiere a los átomos con un número específico de neutrones y con ello un peso atómico particular. Un isótopo radioactivo, o *radioisótopo*, es un isótopo inestable, que emite partículas subatómicas [partículas alfa o beta] y en algunos casos, rayos gamma, mientras se convierte espontáneamente en una forma estable.) Melvin Calvin y sus colegas de la Universidad de California en Berkeley fueron pioneros en este campo al trazar el destino del dióxido de carbono marcado con ^{14}C, $^{14}CO_2$, en algas iluminadas que estaban realizando la fotosíntesis activamente. Su trabajo, desarrollado a finales de los años 40 y principios de los 50, condujo a la elucidación del *ciclo de Calvin,* nombre que recibe la vía más común del metabolismo fotosintético del carbono. El ciclo de Calvin fue la primera vía metabólica descubierta mediante el uso de un radioisótopo.

La bioquímica dio otro gran paso adelante con el desarrollo de la *centrifugación* como método para separar y aislar estructuras subcelulares y macromoléculas en base a su tamaño, forma, y/o densidad, proceso denominado **fraccionamiento subcelular**. Las técnicas de centrifugación usadas para este objetivo incluyen la *centrifugación diferencial* y la *centrifugación en gradiente de densidad*, que separan orgánulos y otras estructuras subcelulares en base a diferencias en tamaño y/o densidad, y la *centrifugación en equilibrio de densidad*, es una técnica poderosa para separar orgánulos y macromoléculas en base a las diferencias de densidad. Cada una de estas técnicas se describe detalladamente en el Anexo12A en las páginas 322-326. La **ultracentrífuga**, desarrollada en Suecia por Theodor Svedberg a finales de los años 20, es especialmente útil para la resolución de pequeños orgánulos y macromoléculas. Una ultracentrífuga es capaz de desarrollar velocidades muy altas —más de 100.000 rpm— y puede por lo tanto someter las muestras a fuerzas que superan 500.000 veces la fuerza de la gravedad (*g*). En gran medida la ultracentrífuga es tan

fundamental para la bioquímica como el microscopio electrónico lo es para la citología. De hecho, ambos instrumentos se desarrollaron más o menos al mismo tiempo, de forma que la capacidad de ver orgánulos y otras estructuras subcelulares se produjo casi simultáneamente con la capacidad de aislarlos y purificarlos.

Otras técnicas biológicas que han sido muy útiles para aislar y purificar componentes subcelulares incluyen la cromatografía y la electroforesis. **Cromatografía** es un término general que incluye una variedad de técnicas en las que se fracciona progresivamente una mezcla de moléculas mientras la solución fluye a través de una fase inmóvil y absorbente, contenida generalmente en una columna. Las técnicas cromatográficas separan moléculas en base al tamaño, la carga o la afinidad por moléculas o grupos funcionales específicos. En la Figura 7.9 de la página 181 se muestra un ejemplo de una técnica cromatográfíca.

Electroforesis hace referencia a diversas técnicas relacionadas que utilizan un campo eléctrico para separar moléculas en base a su movilidad. El ritmo al que cualquier molécula se mueve durante la electroforesis depende de su carga y de su tamaño. El medio más común para la separación electroforética de proteínas y ácidos nucleicos es un gel de agarosa o de poliacrilamida. En la Figura 7.22 de la página 194 se ilustra la utilización de electroforesis en gel de poliacrilamida para la separación de proteínas.

Debido al incremento de la habilidad para ver, fraccionar y aislar estructuras subcelulares, los citólogos y los bioquímicos comenzaron a darse cuenta de que el alcance de sus observaciones sobre la estructura y la función celular respectivamente podían complementarse, estableciendo los fundamentos de la biología celular moderna.

La rama de la genética se centra en el flujo de información

La tercera hebra o rama de la cuerda de la biología celular es la genética. Al igual que las otras dos, tiene raíces importantes en el siglo XIX. En este caso, la hebra comienza con Gregor Mendel, cuyos estudios en las plantas de guisante que cultivó en el jardín de su monasterio están seguramente entre los experimentos más famosos de toda la biología celular. Sus descubrimientos fueron publicados en 1866, estableciendo los principios de la segregación y la diversidad de los «factores hereditarios» que hoy conocemos como **genes**. Estos principios tuvieron una importancia singular y constituyen los fundamentos de lo que posteriormente hemos conocido como la genética mendeliana. Sin embargo, Mendel fue claramente un hombre adelantado a su tiempo. Su trabajo pasó inadvertido cuando se publicó inicialmente y no fue apreciado completamente hasta su redescubrimiento casi 35 años más tarde.

Como preludio de ese redescubrimiento, en la década posterior al trabajo de Mendel se comenzó a apreciar el papel del núcleo en la continuidad genética de las células. En 1880, Walther Flemming identificó los **cromosomas** como cuerpos con forma de hebra presentes en las células que se dividen. Flemming denominó *mitosis* al proceso de división, a partir de la palabra griega para hilo o fibra. Poco después se reconoció el número de cromosomas como una característica distintiva de cada especie que permanece constante de generación en generación. El hecho de que los cromosomas fueran portadores de la información genética fue sugerido por Wilhelm Roux ya en 1883, y fue comunicado más formalmente por August Weissman poco tiempo después.

Una vez que se esclareció la función del núcleo y los cromosomas, se estableció el escenario para el redescubrimiento de las observaciones iniciales de Mendel. Esto se produjo en 1900, cuando sus estudios fueron citados casi simultáneamente por tres genéticos de plantas trabajando independientemente: Carl Correns en Alemania, Ernst von Tschermak en Austria y Hugo de Vries en Holanda. En tres años formuló la **teoría cromosómica de la herencia** Walter Sutton, que fue el primero en unir los «hilos» cromosómicos de Flemming con los «factores hereditarios» de Mendel.

La teoría de Sutton propuso que los factores hereditarios responsables de la herencia mendeliana se localizan en los cromosomas dentro del núcleo. Esta hipótesis recibió su confirmación más fuerte a partir del trabajo de Tomas Hunt Morgan y sus estudiantes de la Universidad de Columbia durante las primeras dos décadas del siglo XX. Ellos eligieron *Drosophila melanogaster*, la mosca común de la fruta, como especie experimental. Morgan y sus colaboradores fueron capaces de relacionar rasgos definidos con cromosomas específicos mediante la identificación de diversos mutantes morfológicos de *Drosophila*.

Mientras tanto, los fundamentos de nuestra comprensión de la base química de la herencia estaban siendo establecidos lentamente. El descubrimiento del DNA por Johan Friedrich Miescher en 1869 fue un hito importante. Miescher aisló y describió lo que denominó «*nucleína*» utilizando fuentes aparentemente tan inapropiadas como el esperma de salmón y el pus humano de las bandejas de cirugía. Pero Miescher, al igual que Mendel, estaba adelantado respecto a su época ya que pasaron aproximadamente 75 años antes de que se considerase completamente el papel de su nucleína como la información genética de la célula.

El DNA fue identificado, ya en 1914, como un componente importante de los cromosomas mediante la tinción de Robert Feulgen que aún se usa en la actualidad. Pero se le dio escasa consideración a la posibilidad de que el DNA pudiera ser el portador de la información genética. De hecho se consideró algo improbable, como consecuencia de la estructura aparentemente carente de interés de los monómeros constituyentes del DNA (denominados nucleótidos) que se conocieron alrededor de 1930. Hasta mediados del siglo XX, se aceptaba comúnmente que los genes esta-

ban constituidos por proteínas, ya que éstas eran los únicos componentes nucleares que parecían justificar la diversidad obvia de los genes.

En 1944, Oswald Avery, Colin MacLeod y Maclyn McCarty describieron un experimento clave que apuntaba claramente al DNA como el material genético. Su trabajo se centró en el fenómeno de transformación genética de bacterias que se discutirá en el Capítulo 18. Su evidencia era convincente, pero la comunidad científica permaneció durante bastante tiempo poco convencida de la conclusión. Sin embargo, sólo ocho años más tarde, como consecuencia del trabajo de Alfred Hershey y Martha Chase se acogió de forma más favorable el hecho de que el DNA, en lugar de las proteínas, entra en la célula bacteriana cuando es infectada por un virus bacteriano.

Al mismo tiempo, George Beadle y Edward Tatum, trabajando en los años 40 del siglo XX en el moho del pan *Neurospora crassa,* formularon el concepto de «un gen-una enzima», afirmando que la función de un gen es controlar la producción de una única proteína específica. Poco tiempo después, en 1953, James Watson y Francis Crick propusieron su ahora famoso **modelo de doble hélice** para la estructura del DNA, incluyendo propiedades que inmediatamente sugirieron cómo podían suceder la replicación y las mutaciones genéticas. Poco después, se descubrieron las propiedades de la función del DNA, estableciéndose que el DNA especifica el orden de monómeros (aminoácidos) y por lo tanto las propiedades de las proteínas, y que diversos tipos de moléculas de RNA (ácido ribonucleico) actúan como intermediarios en la síntesis de proteínas.

Los años 60 condujeron a avances especialmente significativos, incluyendo el descubrimiento de las enzimas que sintetizan el DNA y el RNA (DNA polimerasas y RNA polimerasas, respectivamente) y al «estallido» del código genético, que especifica la relación entre el orden de nucleótidos en una molécula de DNA (o RNA) y el orden de aminoácidos en una proteína. Alrededor del mismo tiempo, Jacques Monod y François Jacob dedujeron el mecanismo responsable de la regulación de la expresión génica en bacterias.

Las técnicas importantes de la rama de la genética, ilustradas en la Figura 1.1, incluyen la separación por ultracentrifugación y electroforesis en gel de moléculas y fragmentos de DNA. La *hibridación de ácidos nucleicos* tiene igual importancia, si no mayor, e incluye una variedad de técnicas relacionadas, que dependen de la capacidad de dos moléculas de ácido nucleico de hebra sencilla con secuencia de bases complementarias, para unirse o *hibridarse* entre ellas, formando así un híbrido de doble hebra. Estas técnicas se pueden aplicar a interacciones DNA-DNA, DNA-RNA, e incluso RNA-RNA, y son muy útiles para el aislamiento de moléculas de DNA o RNA o fragmentos específicos de éstas.

El desarrollo de la tecnología del **DNA recombinante** en los años 70 es el avance tecnológico que sin duda más ha contribuido al entendimiento de la expresión génica. Esa tecnología se hizo posible gracias al descubrimiento de las *enzimas de restricción.* Estas enzimas tienen la habilidad de cortar moléculas de DNA en secuencias específicas llamadas *sitios de restricción*, lo que las hace herramientas poderosas para cortar moléculas largas de DNA en *fragmentos de restricción* más pequeños que pueden ser recombinados de varias formas. Usando estas enzimas, los científicos pueden crear *moléculas de DNA recombinante* que contengan secuencias de DNA con dos orígenes diferentes. Esto condujo rápidamente al desarrollo del *clonaje génico*, un proceso que permite la generación de numerosas copias de secuencias específicas de DNA. Estas técnicas se explicarán y se explorarán detalladamente en los Capítulos 18 y 20.

Alrededor de la misma época, se inventaron métodos para determinar rápidamente las secuencias de bases en fragmentos de DNA. Es muy difícil sobrestimar la importancia de la tecnología de **secuenciación del DNA**. De hecho, la tecnología es trivial y automatizada y se aplica rutinariamente no sólo para genes individuales sino para genomas completos (el contenido total de DNA de una célula). Inicialmente, la secuenciación del genoma se aplicaba principalmente a genomas bacterianos ya que generalmente son relativamente pequeños, de unos pocos millones de bases. Pero la secuenciación de DNA ha sido empleada desde entonces con éxito a genomas mucho más grandes, incluyendo aquellos de especies como levaduras, lombrices, plantas y animales que son de especial interés para los investigadores. La secuenciación del genoma humano entero, que contiene cerca de 3,2 billones de bases, constituye un triunfo esencial. Esta hazaña se alcanzó gracias al *Proyecto Genoma Humano*, un esfuerzo de cooperación internacional que comenzó en 1990, implicó a cientos de científicos, y estableció la secuencia completa del genoma humano alrededor de 2003.

El desafío de analizar la gran cantidad de datos generados por la secuenciación del DNA ha dado lugar a una nueva disciplina llamada **bioinformática** que combina la informática y la biología con objeto de dar sentido a los datos de secuenciación. En el caso del genoma humano, esta aproximación ha conducido al reconocimiento de que existen por lo menos 35.000 genes que codifican para proteínas en el genoma humano. Aproximadamente la mitad de ellos no se conocían antes de la secuenciación del genoma. Ahora que se conocen las secuencias del DNA de esos genes, los científicos están comenzando a observar más allá del genoma para estudiar el *proteoma*, que abarca la estructura y las propiedades de cada proteína producidas por un genoma.

Éstas y otras técnicas han ayudado a fundar la era de la genética molecular que continúa revolucionando la biología. En este proceso, la rama histórica de la genética, que retrocede hasta Mendel, se entrelaza íntimamente con la citología y la bioquímica en la disciplina de biología celular tal y como la conocemos actualmente.

Biología, «hechos» y el método científico

Si nos preguntan qué esperamos obtener de un libro de ciencia, la mayoría de los lectores probablemente responderán que pretenden aprender los hechos relevantes del área científica que trata el libro, biología celular, en el caso del libro que está leyendo ahora. Si nos hacen explicar qué es un hecho, la mayoría de la gente probablemente responderá que un hecho es «algo que sabemos que es cierto». Ese significado de la palabra coincide con el diccionario ya que una de las descripciones de *hecho* es «información que tiene una realidad objetiva».

Sin embargo, para un científico un hecho es una información mucho más débil de lo que puede implicar la definición. Los «hechos» en ciencia son únicamente intentos de explicar nuestro entendimiento actual del mundo natural que nos rodea basándonos en observaciones y experimentos que podemos realizar. La verdad para un investigador, tal como lo describió tan apropiadamente un científico, «no es un reducto de certeza que debamos defender contra el error sino que es un lugar de sombra donde podemos comer antes de continuar la marcha» (White, 1968, p. 3).

La biología celular es rica en ejemplos de «hechos» que fueron aceptados de forma general, pero que posteriormente fueron rechazados a medida que los biólogos celulares continuaron su marcha para intentar explicar los fenómenos a los que se refieren esos hechos. Por ejemplo, ya en el siglo XIX se mantenía de forma generalizada (es decir, considerándolo como un hecho) que la materia viva consistía en sustancias distintas de la materia inerte. De acuerdo con esta interpretación, denominada *vitalismo*, las reacciones químicas que suceden en la materia viva no siguen las leyes de la química y de la física, sino que son guiadas por una «fuerza vital». Entonces apareció la demostración de Friedrich Wöhler (en 1828) de que el producto biológico urea podía ser sintetizado en el laboratorio a partir de un compuesto inorgánico, echando abajo uno de los «hechos» del vitalismo. El otro «hecho» fue refutado por el trabajo de Eduard y Hans Buchner que mostraron (en 1897) que los extractos sin vida obtenidos a partir de levaduras podrían fermentar el azúcar en etanol. De esta forma, lo que se había considerado como un «hecho» durante generaciones de científicos, fue finalmente desacreditado y reemplazado por un nuevo «hecho» consistente en que los componentes en las reacciones de la materia viva no constituyen un mundo aparte sino que siguen las leyes de la química y de la física.

Como ejemplo más contemporáneo, consideremos lo que sabemos acerca de la energía necesaria para mantener la vida. Hasta hace poco se consideraba como un hecho el que el sol era la fuente última de toda la energía de la biosfera, de forma que todos los organismos o bien usan a la energía solar directamente (por ejemplo, las plantas verdes, las algas y algunas bacterias) o bien es parte de una cadena alimenticia mantenida por los organismos fotosintéticos. Entonces se descubrió los afloramientos de aguas termales del fondo del mar y las comunidades prósperas de organismos que viven alrededor de ellas, ninguna de las cuales depende de la energía solar. Por el contrario, estos organismos dependen de la energía que es extraída a partir de los enlaces de sulfuro de hidrógeno (H_2S) por las bacterias que viven alrededor de los afloramientos termales y que empleará para sintetizar compuestos orgánicos a partir de dióxido de carbono. Esas bacterias constituyen la base de las cadenas alimenticias que incluyen al *zooplancton* (animales microscópicos), a gusanos, y a otros residentes en el medio de los afloramientos termales.

Así, los «hechos» que se presentan en los libros de texto de biología como éste no son más que nuestros mejores intentos de describir y explicar el funcionamiento del mundo biológico que nos rodea. Están sometidos a cambios a medida que conocemos información nueva o mejor.

¿Cómo disponemos de información nueva y mejor? Los científicos normalmente adquieren información nueva mediante una aproximación sistemática denominada el *método científico*. Como se indica en la Figura 1B-1 el método científico comienza cuando un investigador *realiza observaciones* en el campo o en un laboratorio de investigación. En base a esas observaciones y al conocimiento obtenido en estudios previos, los científicos formulan una *hipótesis comprobable*, una explicación posible o un modelo compatible con las

«Hechos» y el método científico

Familiarizarse con una rama de la ciencia como la biología celular significa, al menos en parte, aprender algunos *hechos* acerca de ella. Incluso en este breve capítulo introductorio nos hemos encontrado algunos hechos de la biología celular. Cuando decimos por ejemplo que «todos los organismos están formados por una o más células» o que «el DNA es el portador de la información genética», reconocemos estas afirmaciones como hechos de la biología celular. Pero también reconocemos que la primera de estas afirmaciones fue considerada inicialmente como parte de una teoría y la segunda afirmación reemplazó al concepto erróneo de que los genes estaban formados por proteínas.

Por lo tanto, un *hecho* científico es una información mucho más débil que las implicaciones del sentido cotidiano de la palabra hecho. Para un científico un «hecho» es simplemente un intento de establecer nuestro mejor entendimiento de un fenómeno específico, y es únicamente válido hasta que es revisado o reemplazado por una explicación mejor. El Anexo 1B explica el significado de algunos «hechos» en biología y el **método científico** mediante el cual obtenemos información nueva y mejor.

Tal y como consideramos el método científico, debemos conocer algunos términos importantes que los científicos usan para indicar el grado de veracidad de una explicación o un concepto considerado como verdadero. Hay

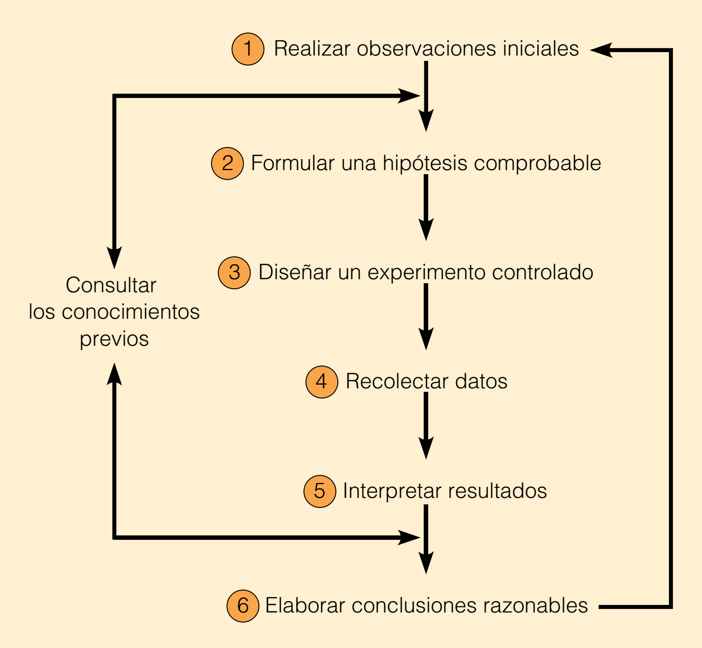


Figure 1B.1 **El método científico.**

observaciones y con el conocimiento previo y que puede ser comprobado experimentalmente. A continuación, el investigador *diseña un experimento controlado* para comprobar la hipótesis variando algunas condiciones y manteniendo todo lo demás tan constante como sea posible. Entonces, el científico *recoge los datos, interpreta los resultados y establece conclusiones razonables* que obviamente deben ser compatibles, no sólo con los resultados de ese experimento en particular sino también con el conocimiento previo.

Para un científico en activo el método científico es más una forma de pensar que un protocolo que debe ser seguido. Ésta es, muy probablemente, la forma en que nuestros antecesores explicaron e interpretaron los fenómenos naturales mucho antes de que los científicos fueran formados en las universidades y mucho antes de que los estudiantes leyesen ensayos sobre el método científico.

Cuando se ilustra en un diagrama como el de la Figura 1B-1 el método científico parece muy preciso y ordenado. Sin embargo, no todos los descubrimientos científicos se hacen de esta forma. Muchos avances importantes en biología se han realizado de forma accidental más que de forma planeada. Un ejemplo clásico es el descubrimiento de la penicilina en 1928 por Alexander Fleming. Flemming, un médico y bacteriólogo escocés, dejó accidentalmente sin tapar una placa de cultivo de bacterias *Staphilococus,* de forma que estuvo expuesta a la contaminación por otros microorganismos. Flemming estuvo a punto de desechar el cultivo contaminado cuando se dio cuenta de la presencia de algunas zonas claras en las que las bacterias no estaban creciendo. Flemming mantuvo la placa se cultivo, y razonando que el crecimiento bacteriano podría haber sido inhibido por algún contaminante del aire y reconociendo la importancia que podría tener un inhibidor del crecimiento bacteriano, comenzó a intentar aislar y caracterizar la sustancia. La identificación de la penicilina y la demostración de que era el producto derivado de un moho fue realizada por otros, pero Fleming es reconocido por el descubrimiento inicial.

Los Anexos de los capítulos siguientes le pondrán al corriente de otros ejemplos de descubrimientos aparentemente accidentales. Independientemente de cómo de accidentales puedan parecer esos descubrimientos casi siempre es verdad que «la casualidad favorece a las mentes preparadas». Detrás de la aparente «casualidad» de cada descubrimiento hay una «mente preparada» que ha sido entrenada para observar cuidadosamente y pensar astutamente.

A medida que avance este texto trate de aplicar el método científico. Independientemente de la aproximación, observará que las conclusiones de cada experimento proporcionan información de cómo funcionan los sistemas biológicos y habitualmente nos conducirán a nuevas preguntas, continuando el ciclo de la investigación científica. Esto es bueno si aspira a dedicarse la investigación ya que el mejor seguro para comenzar es que aún existan preguntas por responder.

tres términos que son especialmente significativos: *hipótesis, teoría* y *ley*.

De estos tres términos, **hipótesis** es el más provisional. Una hipótesis es simplemente una afirmación o una explicación compatible con la mayor parte de las observaciones y las evidencias experimentales disponibles hasta el momento sobre un tema. Supongamos por ejemplo que usted ha sentido ardor de estómago tres veces durante el último mes, y que cada vez ha comido pizza de *pepperoni* poco antes de sentir el ardor de estómago. Una hipótesis razonable podría ser que el ardor de estómago está de alguna forma asociado al consumo de pizza de *pepperoni*. A menudo, una hipótesis se transforma en un *modelo* que parece proporcionar una explicación razonable al fenómeno en cuestión.

Para ser útil a los científicos, una hipótesis debe ser *comprobable*, es decir, debe ser posible diseñar un experimento controlado que confirmará o rechazará la hipótesis. En base a observaciones iniciales y al conocimiento previo (muy probablemente a partir del trabajo de otros investigadores) los científicos formulan una hipótesis comprobable y diseñan un experimento controlado para determinar si la hipótesis es respaldada por datos u observaciones (*véase* Figura 1B.1).

Cuando una hipótesis o un modelo se han comprobado de manera crítica, en diversas condiciones —normal-

mente por diversos investigadores usando diversas aproximaciones— y es respaldada por la evidencia de forma consistente, adquiere gradualmente el estatus de **teoría**. Cuando una explicación o un modelo se transforman en una teoría es porque generalmente es aceptada por la mayoría de los científicos de un determinado campo. La *teoría celular* descrita anteriormente en este capítulo es un ejemplo excelente de esto. No existen, o hay muy pocos desacuerdos entre los biólogos respecto a sus tres postulados. Dos afirmaciones más recientes que han adquirido el estatus de teoría y que encontraremos en el Capítulo 7 son el *modelo quimiosmótico,* que explica cómo la generación del ATP mitocondrial se origina por un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna (discutido en el Capítulo 10), y el *modelo del mosaico fluido* sobre la estructura de la membrana.

Cuando una teoría se ha comprobado y confirmado por muchos investigadores y durante un periodo de tiempo suficiente para que no existan dudas, puede eventualmente ser denominada como **ley**. La *ley de la gravedad*, así como diversas *leyes de termodinámica* que encontraremos en el capítulo 5 son buenos ejemplos que nos vienen fácilmente a la memoria. También puede estar familiarizado con la ley de la difusión de Fick, las leyes de los gases ideales y otros conceptos de la física y de la química que son generalmente aceptados como leyes. Algunos de los ejemplos más sobresalientes de leyes en biología proceden de la genética, por ejemplo, las *leyes de la herencia* de Mendel y la *ley de Hardy-Weinberg.* Sin embargo, los biólogos son en general bastante conservadores con el término. La teoría celular se considera únicamente con una teoría incluso después de 150 años. Quizás nuestras reticencias a denominar algunas explicaciones de fenómenos biológicos con leyes reflejan la gran diversidad de formas de vida, y la consecuente dificultad para convencernos de que nunca encontraremos organismos o células que constituyen excepciones incluso para nuestras teorías mejor documentadas.

Perspectiva

El mundo biológico es un mundo de células. Todos los organismos vivos están formados por una o más células, cada una de las cuales procede de una célula preexistente. Aunque la importancia de las células en la organización biológica se ha reconocido durante 150 años, la disciplina de la biología celular, tal y como la conocemos actualmente, tiene un origen mucho más reciente. La biología celular moderna se ha producido por el entrelazamiento de tres disciplinas históricas distintas —citología, bioquímica y genética— que en sus fases iniciales probablemente no parecían estar tan relacionadas. El biólogo celular contemporáneo debe comprender las tres corrientes ya que éstas se complementan en la búsqueda para aprender qué son y cómo funcionan las células.

Problemas

Los problemas de mayor dificultad están marcados con un •.

1.1 Corrientes históricas de la biología celular. Indique si cada uno de los siguientes eventos en el desarrollo de la biología celular pertenece principalmente a la citología (C), a la bioquímica (B) o a la genética (G).

(a) Köllicker describe «sarcosomas» (ahora denominados mitocondrias) en las células musculares (1857).

(b) Hoppe-Seyler aísla la proteína hemoglobina en forma cristalina (1864).

(c) Haeckel postula que el núcleo es responsable de la herencia (1868).

(d) Ostwald prueba que las enzimas son catalizadores (1893).

(e) Muller descubre que los rayos X inducen mutaciones (1927).

(f) Davson y Danielli postulan un modelo para la estructura de las membranas celulares (1935).

(g) Beadle y Tatum formulan la hipótesis de un gen-una enzima (1940).

(h) Claude aísla las primeras fracciones mitocondriales a partir del hígado de la rata (1940).

(i) Lipmann postula la gran importancia del ATP en las transacciones celulares de energía (1940).

(j) Avery, MacLeod y McCarty demuestran que la transformación bacteriana es atribuible al DNA y no a las proteínas (1944).

(k) Palade, Porter y Sjøstrand desarrollan técnicas para la fijación y el seccionamiento de tejidos biológicos para microscopía electrónica (1952-1953).

(l) Lehninger demuestra que la fosforilación oxidativa depende del transporte de electrones en la mitocondria como fuente inmediata de energía (1957).

1.2 Tamaños celulares. Considere estos ejemplos específicos para apreciar las diferencias en tamaño celular ilustradas en la Figura 1A.1 de la página 2. *Escherichia coli,* una célula bacteriana típica, tiene forma cilíndrica con un diámetro de alrededor de 1 μm y una longitud de alrededor de 2 μm. Como ejemplo de célula animal típica consideraremos una célula de

hígado humana que tiene forma aproximadamente esférica con un diámetro de unas 20 μm. Como célula vegetal típica consideraremos las células columnares del parénquima en empalizada localizadas inmediatamente por debajo de la superficie del haz de las hojas de muchas plantas. Estas células tienen forma cilíndrica, con un diámetro de unas 20 μm y una longitud de aproximadamente 35 μm.

(a) Calcule el volumen aproximado de cada uno de estos tres tipos celulares en micrómetros cúbicos. (Recuerde que $V = \pi r^2 h$ para un cilindro y que $V = 4\pi r^3/3$ para una esfera.)

(b) ¿Cuántas células bacterianas podrían caber aproximadamente en el interior de una célula hepática humana?

(c) ¿Cuántas células hepáticas humanas podrían caber dentro de una célula del parénquima en empalizada?

1.3 Midiendo el tamaño de las cosas. Considere los siguientes cálculos para apreciar los tamaños de las estructuras subcelulares mostradas en la Figura 1A.2 en la página 3:

(a) Todas las células y muchas estructuras subcelulares están rodeadas por una membrana. Asumiendo que una membrana típica tiene 8 nm de ancho, ¿cuántas de estas membranas deberían estar apiladas lateralmente para que se pudiesen observar con un microscopio óptico? ¿Cuántas con un microscopio electrónico?

(b) Los ribosomas son estructuras celulares en los que tiene lugar la síntesis de proteínas. Un ribosoma humano es una estructura aproximadamente esférica con un diámetro de unos 30 nm. ¿Cuántos ribosomas cabrían en el interior de una célula hepática humana descrita en el Problema 1.2, si ésta se rellena completamente con ribosomas?

(c) El material genético de una célula de *Escherichia coli,* descrito en el Problema 1.2, consiste en una molécula de DNA con un diámetro de 2 nm y una longitud total de 1,36 mm (de hecho la molécula es circular con un perímetro de 1,36 mm). Para que esta molécula tan grande de DNA quepa en una célula que sólo tiene unos pocos micrómetros de largo está fuertemente enrollada y doblada en un nucleoide que ocupa una porción pequeña del volumen de la célula. Calcule el volumen posible más pequeño en el que podría caber una molécula de DNA y expréselo como porcentaje del volumen interno de la célula bacteriana que calculó en el Problema 1.2a.

1.4 Límites de resolución. Entonces y ahora. Conteste cada una de las siguientes preguntas en base a lo que ha aprendido en este capítulo acerca del límite de resolución de microscopio óptico. Asuma que el ojo humano tiene un límite de resolución de unos 0,25 mm y el microscopio óptico moderno tiene una capacidad útil de aumentar de unos 1.000 aumentos.

(a) Defina el *límite de resolución* con sus propias palabras. ¿Cuál era el límite de resolución del microscopio de Hooke? ¿Y el del microscopio de van Leeuwenhoek?

(b) ¿Cuáles son las dimensiones aproximadas de la estructura más pequeña que Hooke pudo haber sido capaz de observar con su microscopio? ¿Pudo él haber sido capaz de observar alguna de las estructuras mostradas en la Figura 1A.1? Si es así, ¿cuáles? Si no es el caso, ¿por qué no?

(c) ¿Cuáles son las dimensiones aproximadas de la estructura más pequeña que van Leeuwenhoek pudo haber sido capaz de observar con su microscopio? ¿Pudo el haber sido capaz de observar alguna de las estructuras mostradas en la Figura 1A.1? Si es así, ¿cuál es? Si no es el caso, ¿por qué no?

(d) ¿Cuáles son las dimensiones aproximadas de la estructura más pequeña que los biólogos celulares contemporáneos pueden observar con un microscopio óptico moderno?

(e) Considere las ocho estructuras mostradas en las Figuras 1A.1 y 1A.2, ¿cuáles fueron capaces de estudiar tanto Hooke como van Leeuwenhoek con sus respectivos microscopios? Si es el caso, ¿cuáles fue capaz de observar van Leeuwenhoek pero no Hooke? Explique su razonamiento. Si es el caso, ¿cuáles sería capaz de ver un biólogo celular contemporáneo que no fueron capaces de ver ni Hooke ni van Leeuwenhoek?

1.5 Las ramas contemporáneas de la biología celular. Indique si cada par de técnicas enumeradas corresponden a la rama citológica, bioquímica, o genética de la biología celular (*véase* la Figura 1.1). Sugiera una ventaja que la segunda técnica de cada par tiene sobre la primera.

(a) Microscopía óptica/microscopía electrónica.

(b) Centrifugación/ultracentrifugación.

(c) Hibridación de ácidos nucleicos/secuenciación de DNA.

(d) Secuenciación de un genoma/bioinformática.

(e) Microscopía electrónica de transmisión/microscopía electrónica de barrido.

(f) Cromatografía/electroforesis.

1.6 Los «hechos» de la vida. Cada una de las siguientes afirmaciones fue enunciada en su momento como un hecho biológico pero ahora se entiende que no son ciertas. Indique en cada caso por qué se pensó que cada afirmación era cierta y por qué ahora no se consideran un hecho.

(a) Los tejidos animales y vegetales están construidos de manera diferente, porque los tejidos animales no tienen barreras que los dividan en células.

(b) Los organismos vivos no están sujetos por las leyes de la química y la física de la materia inerte, sino que están gobernados por una «fuerza vital» responsable de la formación de compuestos orgánicos.

(c) Los genes muy probablemente están formados por proteínas porque el otro probable candidato, el DNA, es una molécula relativamente poco interesante que únicamente consiste en cuatro tipos de monómeros (nucleótidos) ordenados en una secuencia relativamente invariante de cuatro nucleótidos repetidos.

(d) La fermentación del azúcar en alcohol sólo se produce si están presentes levaduras vivas.

•1.7 Mas «hechos» de la vida. Cada una de las siguientes afirmaciones ha sido considerada un hecho biológico hasta hace relativamente poco pero ahora han sido rechazadas o modificadas hasta cierto punto. Discuta en cada caso, por qué se consideró cierta cada afirmación y trate de determinar qué evidencias pueden haber sido necesarias para rechazar o modificar estas afirmaciones. (*Nota:* este problema requiere una

búsqueda más activa que el Problema 1.6, pero para ayudar en la búsqueda se incluyen referencias de los capítulos.)

(a) Se puede pensar en una membrana biológica como un sándwich de proteínas-lípidos que consiste en un interior formado exclusivamente por fosfolípidos, recubiertos en ambas caras por capas finas de proteínas (Capítulo 7).

(b) Las enzimas requeridas para catalizar la conversión de azúcar en un compuesto denominado piruvato se localizan invariablemente en el citoplasma de la célula, en lugar de estar compartimentalizadas en estructuras rodeadas por membranas (Capítulo 9).

(c) El mecanismo por el que la oxidación de moléculas orgánicas como azúcares conduce a la generación de ATP, requiere una molécula intermediaria fosforilada de alta energía (Capítulo 10).

(d) Cuando el dióxido de carbono del aire se «fija» (une covalentemente) en formas orgánicas por los organismos fotosintéticos como las plantas verdes, la primera forma molecular en que aparece el átomo de carbono es siempre el compuesto tricarbonado 3-fosfoglicerato (Capítulo 11).

(e) El DNA siempre existe como un duplex de dos hebras únicas en una hélice dextrógira (Capítulo 18).

(f) El código genético, que especifica cómo la información contenida en la molécula de DNA se emplea para hacer proteínas, es universal en el sentido de que todos los organismos utilizan el mismo código (Capítulo 21).

•**1.8 Biología celular en 1875.** Friedrich Miescher (1844-1895), Gregor Mendel (1822-1884), Louis Pasteur (1822-1895) y Rudolf Virchow (1821-1902) fueron científicos europeos (de Suiza, Austria, Francia y Alemania, respectivamente) cuyos descubrimientos más importantes se hicieron en un periodo de 20 años entre 1855 y 1875. Asuma que estos cuatro hombres se reunieron en una conferencia científica en 1875 para discutir sus contribuciones respectivas en biología.

(a) ¿Qué habrían tenido en común estos cuatro científicos?

(b) ¿Qué cree que Pasteur hubiese encontrado más intrigante o relevante en el trabajo de Virchow? Explique su respuesta.

(c) ¿Qué cree que Virchow hubiese encontrado más intrigante o relevante en el trabajo de Mendel? Explique su respuesta.

(d) ¿En el trabajo de quién piensa usted que Miescher habría estado más interesado? Explique su respuesta.

•**1.9 Hechos y verdades.** Lynn White, Jr. hizo una caracterización apropiada del hecho científico. Como se cita en el Anexo 1B, White escribió que para un científico la verdad «no es un reducto de certeza que debamos defender contra el error sino que es un lugar de sombra donde podemos comer antes de continuar la marcha. Explique lo que White quiso decir con su expresión. ¿En qué sentido podría servir para explicar los hechos científicos? ¿Cómo se relaciona esta afirmación con el método científico?

•**1.10 Pizza, ardor de estómago y el método científico.** Aunque puede resultar extraño describir el método científico en términos formales o como se representa en la Figura 1B.1 en la página 15, en realidad no es muy distinto a cómo la mayoría de nosotros contestamos preguntas para resolver los problemas. Probablemente usted use el método científico frecuentemente sin darse cuenta de ello. Suponga por ejemplo que recientemente ha tenido ardor de estómago de manera frecuente. Estudiando sus hábitos de comida durante unas semanas se da cuenta de que es más frecuente que el ardor de estómago suceda las noches después de haber cenado pizza, especialmente si es su pizza favorita con *pepperoni*, anchoas y cebolla. Usted se pregunta si el ardor de estómago puede estar causado por comer pizza, y si es así cuál de sus ingredientes puede ser el culpable.

(a) Describa cómo haría para determinar si el ardor de estómago es debido a pizza, y si es así, a cuál de sus ingredientes.

(b) Ahora compare su aproximación con el método científico como se muestra en la Figura 1B.1. ¿Cómo de científico fue su método?

Bibliografía recomendada

Las referencias con importancia histórica están marcadas con •.

La emergencia de la biología celular moderna

•Bonner, J. T. *Sixty Years of Biology*. New York: Princeton University Press, 1996.
•Bracegirdle, B. Microscopy and comprehension: The development of understanding of the nature of the cell. *Trends Biochem. Sci.* 14 (1989): 464.
•Bradbury, S. *The Evolution of the Microscope*. New York: Pergamon, 1967.
•Calvin, M. The path of carbon in photosynthesis. *Science* 135 (1962): 879.
•Claude, A. The coming of age of the cell. *Science* 189 (1975): 433.
•de Duve, C. Exploring cells with a centrifuge. *Science* 189 (1975): 186.
•de Duve, C. y H. Beaufay. A short history of tissue fractionation. *J. Cell Biol.* 91 (1981): 293s.
•Fruton, J. S. The emergence of biochemistry. *Science* 192 (1976): 327.
•Gall, J. G., K. R. Porter y P. Siekevitz, eds. Discovery in cell biology. *J. Cell Biol.* 91, part 3 (1981).
•Henry, J. *The Scientific Revolution and the Origins of Modern Science*. New York: Palgrave Press, 2001.
•Judson, H. F. *The Eighth Day of Creation: Makers of the Revolution in Biology*. New York: Simon & Schuster, 1979.
•Kornberg, A. Centenary of the birth of modern biochemistry. *Trends Biochem. Sci.* 22 (1997): 282.
•Minsky, M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* 10 (1988): 128.
•Mirsky, A. E. The discovery of DNA. *Sci. Amer.* 218 (June 1968): 78.
•Palade, G. E. Albert Claude and the beginning of biological electron microscopy. *J. Cell Biol.* 50 (1971): 5D.

•Peters, J. A. *Classic Papers in Genetics.* Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, 1959.

•Quastel, H. J. The development of biochemistry in the 20th century. *Canad. J. Cell Biol.* 62 (1984): 1103.

•Rasmussen, N. *Picture Control: The Electron Microscope and the Transformation of Biology in America.* Stanford, CA: Stanford University Press, 1997.

•Schlenk, F. The ancestry, birth, and adolescence of ATP. *Trends Biochem. Sci.* 12 (1987): 367.

•Smith, M. P. Exploring molecular biology: An older surgeon looks at a new universe. *Arch. Surg.* 130 (1995): 811.

•Stent, G. C. That was the molecular biology that was. *Science* 160 (1968): 390.

•Stent, G. C. y R. Calendar. *Molecular Genetics: An I ntroductory Narrative*, 2d ed. New York: W. H. Freeman, 1978.

•Watson, J. D. *The Double Helix.* New York: Atheneum, 1968.

•Watson, J. *A Passion for DNA.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.

•Zernike, F. How I discovered phase contrast. *Science* 121 (1955): 345.

Métodos en la biología celular moderna

Antia, M. A microscope with an eye for detail. *Science* 285 (1999): 311.

Carlson, S. A kitchen centrifuge. *Sci. Amer.* 278 (January 1998): 102.

Flegler, S. L., J.W. Heckman y K. L. Klomparens. *Scanning and Transmission Microscopy: An Introduction.* New York: W. H. Freeman, 1993.

Ford, T. C. y J. M. Graham. *An Introduction to Centrifugation.* Oxford, England: Bios Scientific.

Gupta, P. D. y H. Yamamoto, eds. *Electron Microscopy in Medicine and Biology.* Enfield, NH: Science Publishers, 2000.

Lichtman, J.W. Confocal microscopy. *Sci. Amer.* 271 (August 1994): 40.

Minsky, M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* 10 (1988): 128.

Olson, A. J. y D. S. Goodsell.Visualizing biological molecules. *Sci. Amer.* 267 (November 1992): 76.

Slayter, R. J., ed. *Radioisotopes in Biology: A Practical Approach.* New York: Oxford University Press.

Sullivan, K. F. y S. A. Kay. *Green Fluorescent Proteins.* San Diego, CA: Academic Press, 1999.

El método científico

Braben, D. *To Be a Scientist: The Spirit of Adventure in Science and Technology.* New York: Oxford University Press, 1994.

Carey, S. S. *A Beginner's Guide to the Scientific Method.* Belmont, CA: Thomson/Wadsworth, 2004.

Gauch, H. G. *The Scientific Method in Practice.* New York: Cambridge University Press, 2003.

Moore, J. A. *Science As a Way of Knowing.* Cambridge, MA: Harvard University Press, 1993.

•White, L., Jr. *Machina ex Deo: Essays in the Dynamism of Western Culture.* Cambridge, MA: MIT Press, 1968.



2

La química de la célula

Los estudiantes que se inician en biología celular algunas veces se ven sorprendidos —ocasionalmente incluso consternados— al encontrar que todos los cursos y libros de texto relacionados con la biología celular implican una cantidad considerable de química. La biología en general, y la biología celular en particular, se fundamentan en gran medida tanto en la química como en la física. Después de todo, las células y los organismos se fundamentan en las leyes del universo físico, de forma que la biología es realmente el estudio de la química en sistemas vivos. De hecho, todo lo que las células son y hacen tiene una base molecular y química. Por lo tanto, únicamente podremos apreciar y entender la estructura y la función celular cuando podamos describirla en términos moleculares y expresar su función en términos de reacciones y eventos químicos.

Intentar apreciar la biología celular sin conocimientos de química sería como intentar apreciar una traducción de Goethe sin conocimiento del alemán. Probablemente entenderíamos la mayor parte del significado, pero gran parte de la belleza y la profundidad de la apreciación se perdería en la traducción. Por esta razón consideraremos el sustrato químico necesario para el biólogo celular. Este capítulo se centra específicamente en varios principios que subyacen en gran parte de la biología celular, como preparación para el capítulo siguiente que se centra en las principales clases de constituyentes químicos en las células.

Los principales puntos de este capítulo se pueden estructurar convenientemente alrededor de cinco principios:

1. *La importancia del carbono.* La química de las células es esencialmente la química de los compuestos que contienen carbono, ya que el átomo de carbono tiene varias propiedades únicas que hacen que sea especialmente conveniente como espina dorsal de moléculas con importancia biológica.
2. *La importancia del agua.* La química de las células es también la química de los compuestos solubles en agua, ya que la molécula de agua tiene varias propiedades únicas que la hacen especialmente conveniente como el solvente universal de los sistemas vivos.
3. *La importancia de las membranas selectivamente permeables.* Dado que la mayor parte de las moléculas con importancia biológica son solubles en agua, las membranas que no se disuelven en agua y son permeables diferencialmente para solutos específicos son muy importantes, tanto para definir los espacios y compartimentos celulares como en el control de los movimientos de las moléculas e iones hacia dentro y hacia fuera de esos espacios y compartimentos.
4. *La importancia de la síntesis y polimerización de pequeñas moléculas.* La mayoría de las moléculas con importancia biológica son o bien pequeñas moléculas orgánicas solubles en agua que pueden ser transportadas a través de membranas o grandes macromoléculas que no pueden. Las macromoléculas biológicas son polímeros formados por la unión de muchas moléculas pequeñas similares o idénticas. La síntesis de macromoléculas por polimerización de subunidades monoméricas es un principio importante de la química celular.
5. *La importancia del auto-ensamblaje.* Las proteínas y otras macromoléculas biológicas compuestas por subunidades monoméricas repetidas son a menudo capaces de auto-ensamblarse en niveles mayores de organización estructural. El auto-ensamblaje es posible porque la información necesaria para especifi-

car la configuración espacial de la molécula es inherente en el orden de monómeros presente en el polímero. El auto-ensamblaje es, sin embargo, en muchos casos controlado por proteínas denominadas «chaperonas moleculares» que participan en el proceso de ensamblaje inhibiendo las interacciones incorrectas que podrían dar lugar a estructuras inactivas.

Dados estos cinco principios, debemos familiarizarnos con los principales temas de química celular antes de aventurarnos en la exploración de lo que significa ser una célula.

La importancia del carbono

El estudio de las moléculas celulares realmente significa estudiar compuestos que contienen carbono. Casi sin excepción, las moléculas importantes para el biólogo celular tienen una espina dorsal, o esqueleto, de átomos de carbono unidos covalentemente. En realidad, el estudio de los compuestos que contienen carbono es el dominio de la **química orgánica.** En sus primeros días, la química orgánica era casi sinónimo de química biológica ya que la mayoría de los compuestos que contienen carbono que los químicos investigaron inicialmente se obtuvieron de fuentes biológicas (de ahí el término *orgánico*, que hace referencia al origen de los compuestos a partir de los organismos). Desde entonces, estos términos han recorrido caminos separados ya que los químicos orgánicos han sintetizado una variedad increíble de compuestos que contienen carbono que no existen naturalmente (es decir, no en el mundo biológico). La química orgánica, por lo tanto, incluye todas las clases de compuestos que contienen carbono, mientras que la **química biológica** (*bioquímica* para abreviar) se relaciona específicamente con la química de los sistemas vivos y constituye, como ya hemos visto, una de las diversas corrientes históricas que forman una parte integral de la biología celular moderna (*véase* Figura 1.1).

El **átomo de carbono** (C) es el átomo más importante de las moléculas biológicas. Las diversidad y estabilidad de los compuestos que contienen carbono se debe a las propiedades específicas del átomo de carbono y especialmente a la naturaleza de las interacciones de los átomos de carbono entre sí así como con un número limitado de elementos que se encuentran en las moléculas con importancia biológica.

La propiedad más fundamental del átomo de carbono es su **valencia** de cuatro, lo que significa que el orbital de electrones más externo carece de cuatro de los ocho electrones necesarios para rellenarlo completamente (Figura 2.1a). Ya que un orbital externo completo es necesario para el estado químico más estable del átomo, los átomos de carbono tienden a asociarse entre sí o con átomos carentes de electrones, permitiendo a los átomos adyacentes a compartir un par de electrones. Para cada uno de esos pares, un electrón procede de cada uno de los átomos. Los átomos que comparten electrones entre sí de esta manera se dice

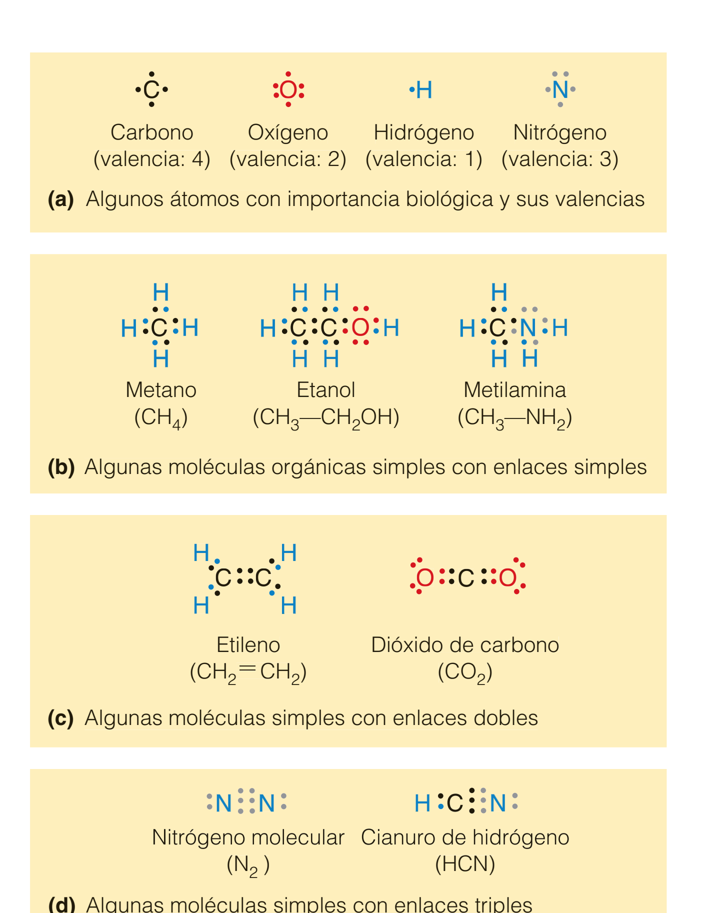


Figura 2.1 Configuración electrónica de algunos átomos y moléculas importantes biológicamente. Se muestran las configuraciones electrónicas de los átomos de carbono, oxígeno, hidrógeno y nitrógeno (**a**) y de moléculas orgánicas simples con enlaces sencillos (**b**), dobles enlaces (**c**) y triples enlaces (**d**). Únicamente se muestran los electrones del orbital electrónico más externo. En cada caso, los electrones localizados entre átomos adyacentes representan un par de electrones compartido, cada uno de ellos perteneciente a átomo. Los electrones del carbono, oxígeno, hidrógeno y nitrógeno son negros, rosas, azules y grises, respectivamente. (Todos los electrones son equivalentes, por supuesto, el código de color es simplemente para ilustrar qué electrones proceden de cada átomo.)

que están unidos por un **enlace covalente**. Los átomos de carbono tienen mucha probabilidad de formar enlaces covalentes entre sí y con átomos de oxígeno (O), hidrógeno (H), nitrógeno (N) y azufre (S).

Las configuraciones electrónicas de varios de estos átomos se muestran en la Figura 2.1a. Obsérvese que, en cada caso, uno o más electrones son necesarios para completar el orbital externo. El número de electrones «ausentes» corresponde en cada caso con la valencia del átomo e indica el número de enlaces covalentes que puede formar el átomo. El carbono, el oxígeno y el nitrógeno son los elementos más ligeros que forman enlaces covalentes compartiendo pares de electrones. El bajo peso atómico hace a los compuestos resultantes especialmente estables porque la

fuerza del enlace covalente es inversamente proporcional a los pesos atómicos de los elementos implicados en el enlace.

Los compuestos orgánicos estables tienen cuatro enlaces covalentes por cada átomo de carbono debido a que se necesitan cuatro electrones para llenar el orbital más externo del carbono. El metano, el etanol y la metilamina son algunos ejemplos simples de estos compuestos que contienen únicamente **enlaces sencillos** entre los átomos (Figura 2.1b). Algunas veces, dos o incluso tres pares de electrones pueden ser compartidos por los átomos dando lugar a **dobles enlaces** o **triples enlaces.** El etileno y el dióxido de carbono son ejemplos de compuestos con dobles enlaces (Figura 2.1c). Encontramos triples enlaces en el nitrógeno (N_2) molecular y en el cianuro de hidrógeno (Figura 2.1d). De esta forma, tanto la valencia como el bajo peso atómico confieren al carbono propiedades únicas responsables de la diversidad y de la estabilidad de los compuestos que contienen carbono, y confieren al carbono un papel prominente en las moléculas biológicas.

Las moléculas que contienen carbono son estables

Como ya se ha sugerido, la estabilidad de las moléculas orgánicas es una propiedad de la configuración electrónica favorable de cada átomo de carbono en la molécula. La estabilidad se expresa en términos de **energía de enlace** —la cantidad energía requerida para romper un mol (alrededor de 6×10^{23}) de sus enlaces—. (El término *energía de enlace* es una fuente frecuente de confusión. Tenga precaución para no pensar en ella como la energía que está de alguna forma «almacenada» en el enlace, sino como la cantidad energía que es necesaria para romper el enlace). Las energías del enlace se expresan normalmente en *calorías por mol (cal/mol)*, siendo una **caloría** la cantidad energía necesaria para elevar la temperatura de 1 gramo de agua 1 grado centígrado[1].

Romper un enlace covalente requiere una gran cantidad energía. Por ejemplo, el enlace carbono-carbono (C—C) tiene una energía de enlace de 83 kilocalorías por mol (kcal/mol). La energía de enlace de los enlaces carbono-nitrógeno (C—N), carbono-oxígeno (C—O) y carbono-hidrógeno (C—H) está en el mismo rango: 70, 84 y 99 kcal/mol, respectivamente. Se requiere incluso más energía para romper un doble enlace carbono-carbono (C═C; 146 kcal/mol) o un triple enlace carbono-carbono (C≡C; 212 kcal/mol), por lo que estos compuestos son aún más estables.

Podemos apreciar la importancia de estas energías de enlace comparándolas con otros valores de energía relevantes, como se muestra en la Figura 2.2. La mayoría de los

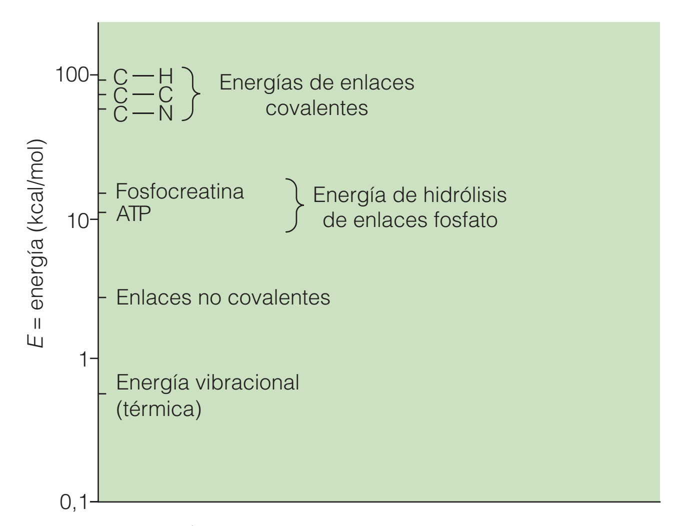


Figura 2.2 Energía de los enlaces en las transiciones con importancia biológica. Observe que la energía está en escala logarítmica para representar amplios rangos de valores.

enlaces no covalentes presentes en moléculas biológicas importantes tienen energías de sólo unas pocas kilocalorías por mol, y la energía de la vibración térmica es incluso más baja —alrededor de 0,6 kcal/mol—. Los enlaces covalentes tienen una energía mucho más alta que los enlaces no covalentes y por lo tanto son estables.

La idoneidad del enlace carbono-carbono para la química biológica de la tierra es especialmente clara cuando se compara su energía con la de la radiación solar. Como se indica en la Figura 2.3 existe una relación inversa entre la longitud de onda de la radiación electromagnética y su contenido energético. La energía de la radiación electromagnética está relacionada específicamente con la longitud de onda a través de la ecuación $E = 28.600/\lambda$, donde λ es la longitud de onda en nm, E es la energía en kilocalorías por einstein y 28.600 es una constante con las unidades kcal-nm/einstein. (Un *einstein* es igual a un mol de fotones). Usando esta ecuación se puede calcular que la parte visible de la luz solar (longitud de onda de 400-700 nm) tiene una energía más baja que el enlace carbono-carbono. Por ejemplo, la luz verde con una longitud de onda de 500 nm tiene un contenido de energía de alrededor de 57,2 kcal/einstein. Por lo tanto, la energía de la luz verde está muy por debajo de la energía de los enlaces covalentes (*véase* Figura 2.2). Si éste no fuese el caso, la luz visible podría romper espontáneamente los enlaces covalentes, y la vida tal y como la conocemos no existiría.

La Figura 2.3 ilustra otro punto importante: el peligro que posee la radiación ultravioleta para las moléculas biológicas. Con una longitud de onda de, por ejemplo, 300 nm, la luz ultravioleta tiene un contenido de energía de alrededor de 95,3 kcal/einstein, claramente suficiente para romper espontáneamente enlaces carbono-carbono. Esta amenaza subyace a la preocupación actual de las poblaciones más que destruyen la capa de ozono en la parte superior de

[1] Energía, calor y trabajo pueden expresarse como *calorías* y *kilocalorías* o en *julios* y *kilojulios*. El julio (J) es la unidad que utilizan los físicos y algunos bioquímicos; la caloría (cal) se sigue utilizando en la mayoría de textos de biología celular, incluido éste. La conversión es sencilla: 1 cal = 4.184 J, o 1 J = 0,239 cal. De igual manera 1 kcal = 4.184 kJ o 1 kJ = 0,239 kcal.

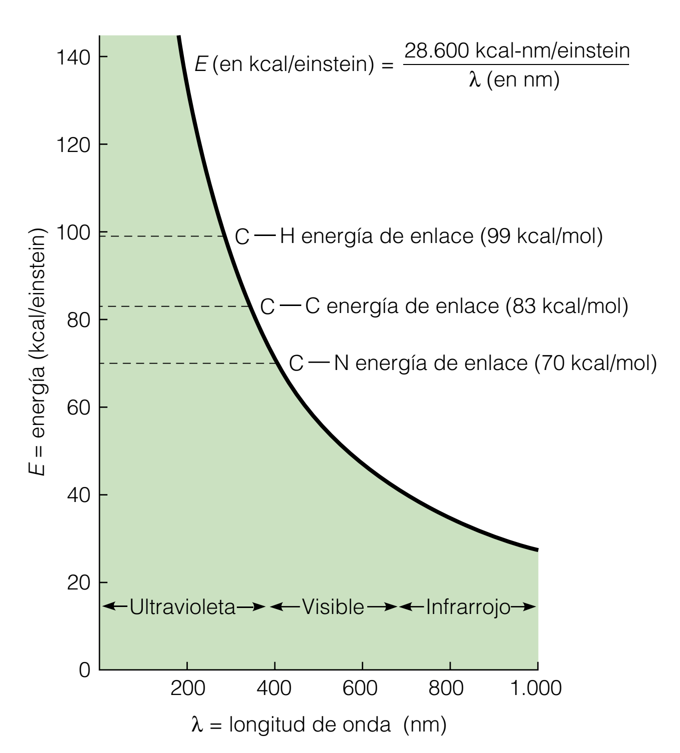


Figura 2.3 **Relación entre energía (*E*) y longitud de onda (λ) de la radiación electromagnética.** Las líneas discontinuas marcan la energía de los enlaces C—H, C—C y C—N.

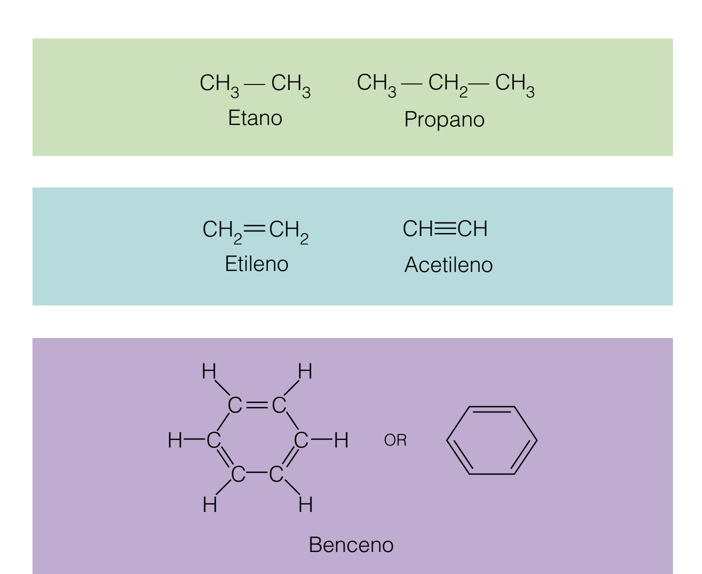


Figura 2.4 **Algunos compuestos hidrocarburos sencillos.** Los compuestos de la fila superior tienen únicamente enlaces sencillos mientras que los de la segunda fila tienen dobles o triples enlaces. La estructura condensada mostrada en la parte derecha para el benceno es un ejemplo de las estructuras simplificadas que usan frecuentemente los químicos para estos compuestos.

la atmósfera ya que la capa de ozono filtra gran parte de la radiación ultravioleta que podría de otra forma alcanzar la superficie de la tierra y causar estragos en los enlaces covalentes que literalmente mantienen unidas a las moléculas biológicas.

Las moléculas que contienen carbono son diversas

Los compuestos que contienen carbono se caracterizan, además de por su estabilidad, porque se pueden generar una gran diversidad de moléculas a partir de relativamente pocas clases de átomos. Otra vez, esta diversidad se debe a la naturaleza tetravalente del átomo de carbono y de la propensión resultante que cada átomo de carbono tiene para formar enlaces covalente con otros cuatro átomos. Debido a que uno o más de esos enlaces se pueden formar con otros átomos de carbono se pueden construir moléculas constituidas por cadenas largas de átomos de carbono. Los compuestos en forma de anillo son también comunes. La introducción de puntos de ramificación y de dobles y triples enlaces en las cadenas de carbono-carbono posibilita una variedad mayor.

Cuando únicamente se usan átomos de hidrógeno para completar los requerimientos de valencia de estas moléculas, lineares o circulares, los compuestos resultantes se denominan **hidrocarburos** (Figura 2.4). Los hidrocarburos son muy importantes económicamente ya que la gasolina y otros derivados del petróleo son mezclas de hidrocarburos de cadena corta como es el octano, compuesto de ocho átomos de carbono (C_8H_{18}).

Por otro lado, los hidrocarburos tienen un papel muy limitado en biología debido a que son esencialmente insolubles en agua, el solvente universal de los sistemas biológicos. Sin embargo, existe una excepción importante a esta regla general: el interior de cada membrana biológica es un medio no acuoso en el que las «colas» de las moléculas de fosfolípidos que se proyectan al interior de la membrana desde cada superficie excluyen al agua y a los compuestos solubles en agua. Como veremos dentro de poco, esta propiedad de las membranas tiene implicaciones importantes para desempeñar su papel como barrera de permeabilidad.

La mayoría de los compuestos biológicos contienen, además de carbono e hidrógeno, uno o más átomos de oxígeno y a menudo nitrógeno, fósforo o azufre. Estos átomos habitualmente forman parte de varios **grupos funcionales** que confieren solubilidad en agua y reactividad química a las moléculas que los contienen. Incluso las moléculas de fosfolípidos cuyas colas hidrocarbonadas contribuyen de manera importante a la naturaleza hidrofóbica del interior de las membranas contienen átomos diferentes al hidrógeno y al carbono.

En la Figura 2.5 se muestran algunos de los grupos funcionales más comunes presentes en las moléculas biológicas. Varios de sus grupos están ionizados o protonados (es decir, que han perdido o ganado un protón, respectivamente) a valores de pH cercanos al pH neutro de la mayoría de las células, incluyendo los grupos *carboxilo y fosfato* cargados negativamente y el grupo *amino* cargado positi-

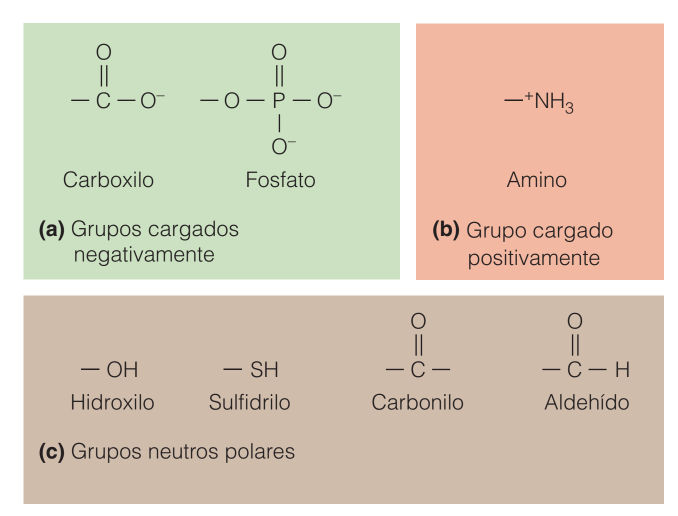


Figura 2.5 **Algunos grupos funcionales comunes presentes en las moléculas biológicas.** Cada grupo funcional se muestra en la forma en la que predomina al pH casi neutro de la mayor parte de las células. (**a**) Los grupos fosfato y carboxilo están ionizados y, por lo tanto, cargados negativamente. (**b**) Por el contrario el grupo amino está protonado y por lo tanto cargado positivamente. (**c**) Los grupos hidroxilo, sulfidrilo, carbonilo y aldehído no tienen carga a valores de pH más próximos a la neutralidad pero son mucho más polares que los hidrocarburos y, por lo tanto, confieren una mayor polaridad y como consecuencia una mayor solubilidad en agua a las moléculas orgánicas a las que están unidos.

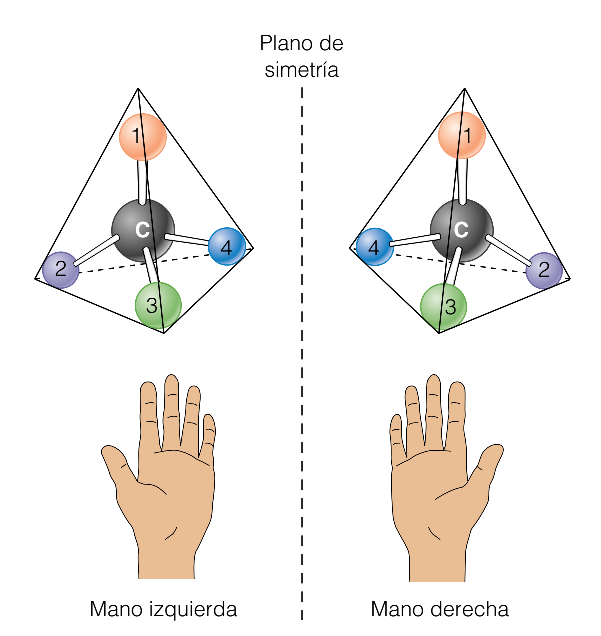


Figura 2.6 **Estereoisómeros.** Los estereoisómeros de los compuestos orgánicos se produce cuando cuatro grupos diferentes están unidos a un átomo de carbono tetraédrico. Los estereoisómeros, como la mano derecha e izquierda, son imágenes especulares que no se pueden superponer. (La línea discontinua del centro de la figura representa el plano de simetría que se puede considerar como el plano de un espejo.)

vamente. Otros grupos como los grupos *hidroxilo, sulfidrilo, carbonilo y aldehído* no están cargados a pH neutros. Sin embargo, éstos causan una redistribución significativa de electrones en las moléculas a las que están unidos, confiriendo por lo tanto a esas moléculas una mayor solubilidad en agua y reactividad química.

Las moléculas que contienen carbono pueden formar estereoisómeros

Las moléculas que contienen carbono son capaces de generar aún una mayor diversidad ya que el átomo de carbono es una estructura tetraédrica con *simetría geométrica* (Figura 2.6). Cuando cuatro átomos o grupos de átomos diferentes están unidos a los cuatro vértices de una estructura tetraédrica son posibles dos configuraciones espaciales. Aunque las dos formas tienen la misma fórmula estructural, no se pueden superponer y son de hecho imágenes especulares (*véase* Figura 2.6). Estas formas de cada compuesto con simetría especular se denominan **estereoisómeros.**

Un átomo de carbono que tiene cuatro sustituyentes diferentes se denomina un **átomo de carbono asimétrico**. Ya que son posibles dos estereoisómeros por cada átomo asimétrico de carbono. Un compuesto con *n* átomos asimétricos de carbono tendrá 2^n estereoisómeros posibles. Como se muestra en la Figura 2.7, el aminoácido de tres átomos de carbono *alanina* tiene un único átomo de carbono asimétrico (en el centro) y por lo tanto tiene dos estereoisómeros llamados L-alanina y D-alanina. (Ninguno de los otros dos átomos de carbono de la alanina es asimétrico, ya que uno tiene tres sustituyentes idénticos y el otro tiene dos enlaces con un átomo de oxígeno.) Los dos estereoisómeros de la alanina están presentes en la naturaleza, pero sólo la L-alanina es un componente de las proteínas.

Como ejemplo de un compuesto con múltiples átomos de carbono asimétricos, consideremos el azúcar de seis átomos de carbono glucosa de la Figura 2.7b. De los seis átomos de carbono de la glucosa los cuatro señalados en negrita son asimétricos. (¿Puede decirnos por qué los otros dos átomos de carbono no son asimétricos?) Con cuatro átomos de carbono asimétricos, la estructura que se muestra para la D-glucosa es sólo una de los 2^4, o 16, estereoisómeros posibles de la molécula $C_6H_{12}O_6$. En este caso, no todos los otros estereoisómeros posibles existen en la naturaleza, principalmente porque algunos son mucho menos favorables energéticamente que otros.

La importancia del agua

Al igual que el carbono tiene una importancia singular por su papel como esqueleto universal de las moléculas con importancia biológica, el agua requiere una atención especial por su papel indispensable como solvente universal en los sistemas biológicos. El agua es de hecho el componente más abundante en las células y organismos. Generalmente, alrededor del 75-85% del peso de una célula es agua, y

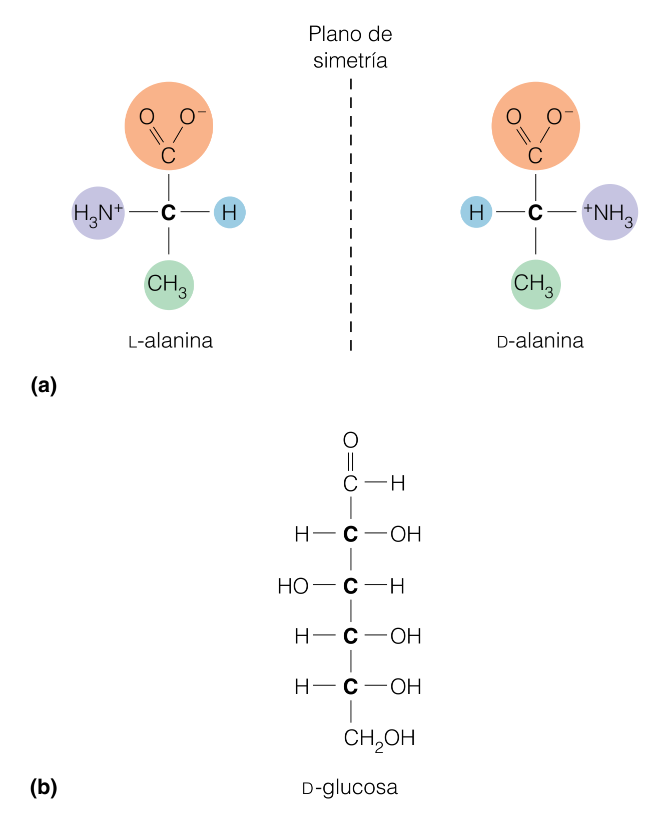


Figura 2.7 Estereoisómeros de moléculas biológicas. (**a**) El aminoácido alanina tiene un único átomo de carbono asimétrico (representado en negrita) y puede por lo tanto existir en dos formas espaciales diferentes, designadas como L-alanina y D-alanina. (La línea discontinua del centro de la figura representa el plano del espejo.) (**b**) La glucosa es un azúcar de seis carbonos que tiene cuatro átomos de carbono asimétricos (representados en negrita), de forma que la D-glucosa es únicamente uno de los $16(2^4)$ posibles estereoisómeros posibles de la molécula $C_6H_{12}O_6$ (aunque nos todas las formas posibles existen en la naturaleza).

muchas células dependen de un medio extracelular que es acuoso igualmente. En algunos casos, las células viven en el propio agua —ya sea un océano, lago o río—, mientras que en otros casos las células pueden estar suspendidas o bañadas por fluidos corporales.

Como sabemos el agua es indispensable para la vida. Es cierto que existen formas de vida que pueden entrar en un «periodo latente» y sobrevivir durante periodos largos de escasez severa de agua. Las semillas de plantas y las esporas de hongos y bacterias están claramente dentro de esta categoría; la humedad del contenido de una semilla seca es frecuentemente tan baja como el 10-20%. Algunas plantas y animales inferiores, como algunos musgos, líquenes, nematodos y rotíferos pueden sufrir adaptaciones fisiológicas que les permiten secarse y sobrevivir en un estado deshidratado durante periodos de tiempo sorprendentemente largos. Estas adaptaciones son claramente una ventaja en medios caracterizados por periodos de sequía. Aun así, éstos son estados latentes y el retorno a la actividad normal siempre requiere la rehidratación.

Para comprender por qué el agua es tan singularmente adecuada para su función necesitamos atender a sus propiedades químicas. El atributo más crítico es claramente su *polaridad*, ya que esta propiedad es responsable de su cohesividad, capacidad para estabilizar la temperatura y sus propiedades como solvente, teniendo todas estas funciones consecuencias importantes para la química biológica.

Las moléculas de agua son polares

Para comprender la naturaleza polar del agua necesitamos considerar la forma de la molécula. Como se muestra en la Figura 2.8a la molécula de agua tiene forma triangular en vez de lineal, con los dos átomos de hidrógeno unidos al oxígeno con un ángulo de 104,5° y no de 180°. No es exagerado afirmar que la vida, tal y como la conocemos, depende críticamente de este ángulo, dadas las propiedades que la asimetría que este ángulo confiere a la molécula del agua. Aunque la molécula completa no está cargada, los electrones tienden a distribuirse desigualmente. El átomo

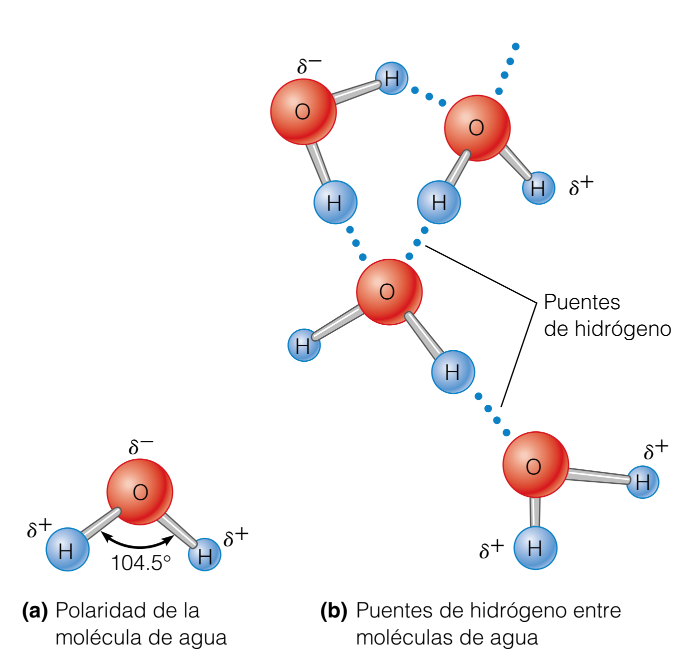


Figura 2.8 Puentes de hidrógeno entre moléculas de agua. (**a**) La molécula de agua es polar debido a una distribución asimétrica de la carga. Los dos átomos de hidrógeno están unidos al oxígeno con un ángulo de 104,5°. El átomo de oxígeno tiene una carga parcial negativa (la letra griega delta hace referencia a «parcial») y por lo tanto es de la porción electronegativa de la molécula. Los dos átomos de hidrógeno son electropositivos y la parte de la molécula en la que se distribuyen tiene carga parcial positiva. (**b**) La amplia asociación entre moléculas de agua en estado líquido o sólido se debe a los puentes de hidrógeno (líneas discontinuas) entre el átomo de oxígeno electronegativo de una molécula y los átomos de hidrógeno electropositivos de moléculas adyacentes. En el hielo la red cristalina es completa y regular; cada oxígeno está unido a través de puentes de hidrógeno con los hidrógenos es de dos moléculas adyacentes. En el agua se mantiene gran parte de esta estructura aunque está desorganizada parcialmente.

de oxígeno en la cabeza de la molécula es **electronegativo**, es decir, tiende a atraer los electrones hacia él confiriendo carga negativa a ese extremo de la molécula y dejando al otro extremo con una carga parcial positiva alrededor de los átomos de hidrógeno. Esta separación de cargas confiere a la molécula de agua a su **polaridad**, que podemos definir como la distribución desigual de cargas dentro de la molécula. En el caso del agua, la polaridad de la molécula tiene consecuencias enormes siendo responsable de la *cohesión*, la *capacidad estabilizadora de la temperatura* y las *propiedades del agua como solvente.*

Las moléculas de agua son cohesivas

Las moléculas de agua, debido a su polaridad, tienen afinidad por ellas mismas y tienden a orientarse espontáneamente de manera que el átomo electronegativo de oxígeno de una molécula se asocia con los átomos electropositivos de hidrógeno de las moléculas adyacentes. Cada una de estas asociaciones se denomina *puente de hidrógeno* y se representa habitualmente como una línea discontinua como en la Figura 2.8b. Cada átomo de oxígeno se puede unir a dos hidrógenos y cada uno de los átomos de hidrógeno se puede asociar de esta forma con los átomos de oxígeno de moléculas adyacentes. Como resultado, el agua se caracteriza por una red tridimensional de moléculas unidas por puentes de hidrógeno (Figura 2.8b). Los puentes de hidrógeno entre moléculas adyacentes se están formando y rompiendo constantemente, teniendo un puente de hidrógeno típico una vida media de unos pocos milisegundos. Sin embargo, como media cada molécula de agua en estado líquido en un momento determinado está unida por puentes de hidrógeno a $3^1/_2$ moléculas adyacentes. En el hielo la cantidad de fuentes de hidrógeno es aún mayor dando lugar a un entramado cristalino rígido y altamente regular, con cada oxígeno unido mediante puentes de hidrógeno a hidrógenos de dos moléculas adyacentes y cada molécula de agua por lo tanto unida a cuatro moléculas vecinas mediante puentes de hidrógeno.

Esa tendencia a formar puentes de hidrógeno entre moléculas adyacentes hace que el agua sea tan altamente cohesiva. Esta cohesión es responsable de que la alta *tensión superficial* del agua, así como de su elevado *punto de ebullición*, *calor específico* y *calor de vaporización*. La elevada tensión superficial del agua produce su capilaridad que permite al agua moverse en sentido ascendente a través de los tejidos conductores de las plantas y permite a los insectos (como el patinador de agua) moverse por la superficie de una charca sin romper la superficie (Figura 2.9).

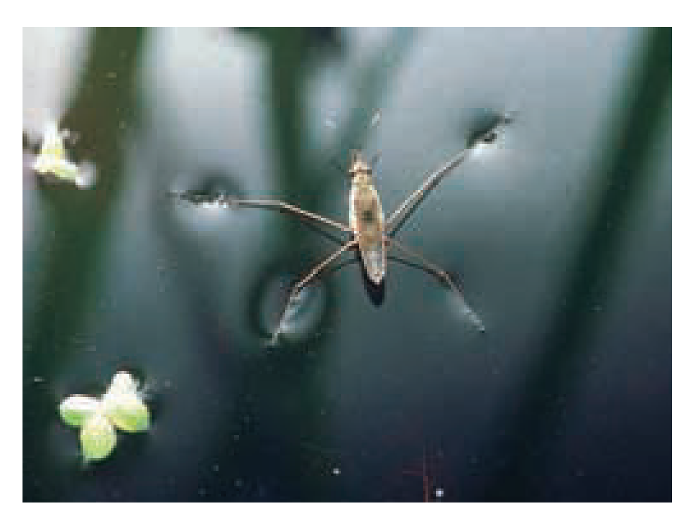


Figura 2.9 **Caminando sobre el agua.** Los insectos como el patinador de agua son capaces de caminar sobre la superficie del agua sin romperla debido a la alta tensión superficial del agua resultante de la fuerza colectiva de sus puentes de hidrógeno.

El agua tiene una alta capacidad estabilizadora de la temperatura

El calor específico elevado es una propiedad importante del agua que confiere al agua su *capacidad estabilizadora de la temperatura* y que deriva directamente de los puentes de hidrógeno entre moléculas adyacentes. **Calor específico** es la cantidad de calor que una sustancia debe absorber por gramo, para incrementar su temperatura 1 °C. El calor específico del agua es de una caloría por gramo.

El calor del específico del agua es mucho más alto que el de la mayoría de los líquidos debido a la abundancia de puentes de hidrógeno. En otros líquidos, gran parte de energía contribuiría directamente a incrementar el movimiento de las moléculas de solvente y por lo tanto a una elevación de la temperatura. En el agua, se emplea por el contrario para romper los puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua adyacentes. En efecto, mediante la absorción de calor que de otra forma incrementaría la temperatura del agua más rápidamente, los puentes de hidrógeno tamponan las soluciones acuosas contra de las variaciones grandes de temperatura. Esta capacidad es importante para el biólogo celular ya que las células liberan grandes cantidades de energía durante las reacciones metabólicas. Esta liberación de energía podría causar un serio problema de sobrecalentamiento para las células, si no fuera por la abundancia de los puentes de hidrógeno y el alto calor específico resultante de las moléculas de agua.

El agua tiene también un **calor de vaporización** elevado, que se define como la cantidad de energía necesaria para convertir 1 g de líquido en vapor. Este valor es alto para el agua debido a que los puentes de hidrógeno tienen que ser destruidos en el proceso. Esta propiedad hace del agua un refrigerante excelente y explica por qué suda la gente, por qué jadean los perros y por qué las plantas pierden agua a través de la transpiración. En cada caso, el calor requerido para evaporar agua es disipado por el organismo, el cual por lo tanto se enfría en este proceso.

A la vista de la elevada capacidad estabilizadora de la temperatura que el agua tiene, gracias a la abundancia de

puentes de hidrógeno, parece adecuado concluir que la vida tal y como la conocemos no podría ser posible si no fuera por la energía necesaria para romper los puentes de hidrógeno entre moléculas de agua adyacentes.

El agua es un solvente excelente

Probablemente la propiedad más importante del agua desde una perspectiva biológica es su excelencia como solvente general. Un **solvente** es un fluido en el que otra sustancia, denominada **soluto**, se puede disolver. El agua es un solvente especialmente bueno con fines biológicos debido a su capacidad para disolver una gran variedad de solutos.

La polaridad del agua es lo que la hace tan útil como solvente. La mayoría de las moléculas de las células son también polares y por tanto interaccionan electrostáticamente con las moléculas de agua, al igual que lo hacen los iones cargados. Los solutos que tienen afinidad por el agua y por lo tanto se disuelven en ella se denominan **hidrofílicos** («que tienen afinidad por el agua»). La mayoría de las moléculas orgánicas pequeñas presentes en las células son hidrofílicas; los azúcares, los ácidos orgánicos y algunos aminoácidos son buenos ejemplos. Las moléculas que no son muy solubles en agua se denominan **hidrofóbicas** («que temen al agua»). Entre los compuestos hidrofóbicos más importantes presentes en las células se encuentran los lípidos y la mayoría de las proteínas que componen las membranas. En general, las moléculas polares tienden a ser hidrofílicas y las moléculas no polares tienden a ser hidrofóbicas. Algunas macromoléculas biológicas, como las proteínas, tienen regiones tanto hidrofílicas como hidrofóbicas, de forma que algunas partes de la molécula tienen afinidad por un medio acuoso, mientras que otras partes de la molécula no la tienen.

Para comprender por qué las sustancias polares se disuelven bien en agua consideremos primero una sal como el cloruro sódico (NaCl) (Figura 2.10). Debido a que es una sal, NaCl existe en forma cristalina como una red de iones de sodio cargados positivamente (Na^+) y de iones de cloro (Cl^-) cargados negativamente. Para que NaCl se disuelva en un líquido, las moléculas de solvente deben vencer la atracción recíproca de los cationes Na^+ y los aniones Cl^-, con cargas opuestas, e implicarlos en cambio en *interacciones electroestáticas* con las moléculas del solvente. Como consecuencia de su polaridad, las moléculas de agua pueden formar **esferas de hidratación** alrededor de Na^+ y Cl^-, neutralizando por tanto su atracción recíproca y disminuyendo la probabilidad de su reasociación. Como se muestra en la Figura 2.10a, la esfera de hidratación alrededor de un catión como el Na^+ implica moléculas de agua agrupadas alrededor del ion con sus extremos negativos (oxígeno) orientados hacia él. Para un anión como el Cl^-, la orientación de las moléculas de agua es la opuesta, con los extremos positivos (hidrógeno) de las moléculas del solvente orientadas hacia el ion (Figura 2.10b).

Algunos compuestos biológicos son solubles en agua ya que existen como formas ionizadas al pH casi neutro de las células y por lo tanto son solubilizadas e hidratadas como los iones de la Figura 2.10. Los compuestos que contienen grupos carboxilo, fosfato o amino se incluyen dentro de esta categoría (*véase* Figura 2.5). La mayoría de los ácidos orgánicos están, por ejemplo, completamente ionizados a un pH próximo a 7, y por eso existen como aniones que se mantienen en solución mediante esferas de hidratación, igual que el ion cloro de la Figura 2.10b. Por otro lado, las aminas están normalmente protonadas a pH celular y existen como cationes hidratados, como el ion sodio de la Figura 2.10a.

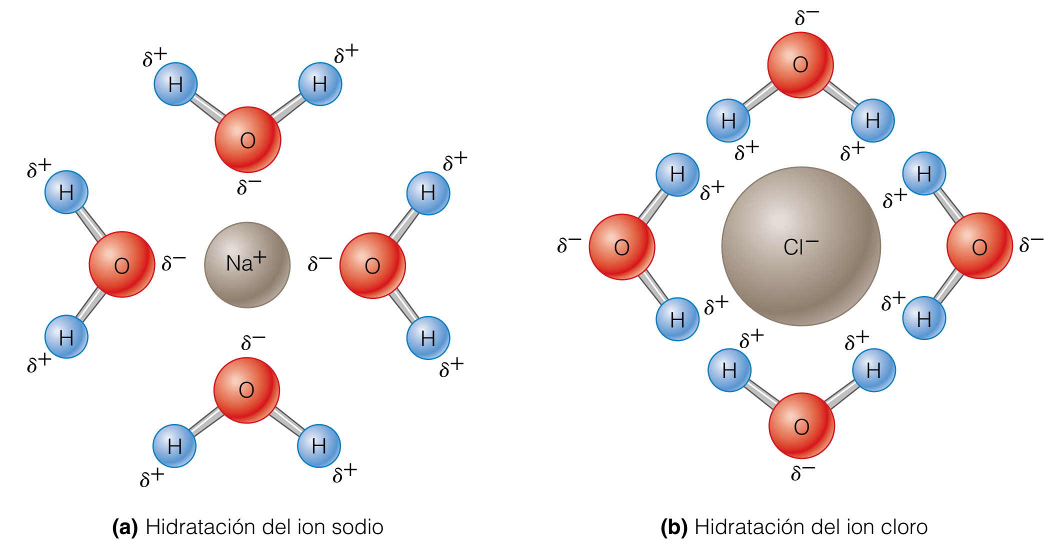


Figura 2.10 Solubilización del cloruro sódico. El cloruro sódico (NaCl) se disuelve en agua debido a la formación de esferas de hidratación alrededor de los iones de sodio (**a**) y de los iones de cloro (**b**). El átomo de oxígeno en los iones de sodio y cloro está representado a escala.

Más frecuentemente, las moléculas orgánicas carecen de carga neta, es decir, no han ganado ni perdido protones y son por lo tanto moléculas neutras. Sin embargo, muchas moléculas orgánicas son hidrofílicas por tener algunas regiones cargadas positivamente y otras regiones cargadas negativamente. Las moléculas de agua tienen a reunirse alrededor de estas regiones, y las interacciones electroestáticas resultantes entre soluto y las moléculas de agua evitan que las moléculas del soluto se asocien. Los compuestos que contienen grupos hidroxilo, sulfidrilo, carbonilo o aldehído, como se muestran en la Figura 2.5, se incluyen habitualmente en esta categoría.

Las moléculas hidrofóbicas, por otro lado, no tienen este tipo de regiones polares y por lo tanto no muestran tendencia a interaccionar electrostáticamente con las moléculas de agua. De hecho, rompen la estructura de los puentes de hidrógeno del agua y por esta razón tienden a ser excluidas de las moléculas de agua. Por tanto, las moléculas hidrofóbicas tienden a coalescer en un medio acuoso, asociándose entre ellas más que con el agua. Esta asociación se debe más a la fuerte tendencia de las moléculas de agua para formar puentes de hidrógeno y excluir a las moléculas que rompen dichos puentes, que a la afinidad específica de las moléculas hidrofóbicas entre ellas. Como veremos más tarde en el capítulo, estas asociaciones de moléculas hidrofóbicas (o partes de moléculas) constituyen una fuerza muy importante en el plegamiento de moléculas, el ensamblaje de estructuras celulares y la organización de las membranas.

La importancia de las membranas con permeabilidad selectiva

Cada célula u orgánulo necesita algún tipo de barrera física para mantener dentro a sus contenidos y fuera a los materiales externos, así como algunos mecanismos para controlar el intercambio entre su medio interno y externo. De manera ideal, una barrera como ésta debería ser impermeable a la mayor parte de las moléculas e iones presentes en las células y sus alrededores. De otra forma, las sustancias podrían difundir libremente hacia el interior y el exterior, y la célula no tendría un contenido definido en absoluto. Por otro lado, la barrera no puede ser completamente impermeable, ya que entonces no podrían tener lugar los intercambios necesarios entre la célula y su medio. Además, una barrera como ésta debe ser insoluble en agua, de forma que no sea disuelta por el medio acuoso de la célula. Al mismo tiempo, debe ser realmente permeable al agua ya que el agua es el solvente básico de la célula y debe ser capaz de fluir hacia el interior o exterior de la célula según sea necesario.

Como cabría esperar, las membranas que rodean a células y orgánulos satisfacen admirablemente esos criterios. Una **membrana** es esencialmente una barrera de permeabilidad hidrofóbica que contiene *fosfolípidos, glicolípidos* y *proteínas de membrana*. En la mayoría de organismos, salvo las bacterias, las membranas también contienen *esteroles-colesterol* en el caso de células animales y *fitosteroles* en las membranas de las células vegetales. (No se preocupe si no se ha encontrado anteriormente con estos tipos de moléculas; las veremos en el Capítulo 3).

La mayoría de los lípidos y proteínas de membrana no son simplemente hidrofóbicos, tienen regiones tanto hidrofílicas como hidrofóbicas y se denominan **moléculas anfipáticas** (el prefijo griego *anfi* significa «de dos clases»). La naturaleza anfipática de los fosfolípidos de membrana se ilustra en la Figura 2.11, que muestra la estructura de la

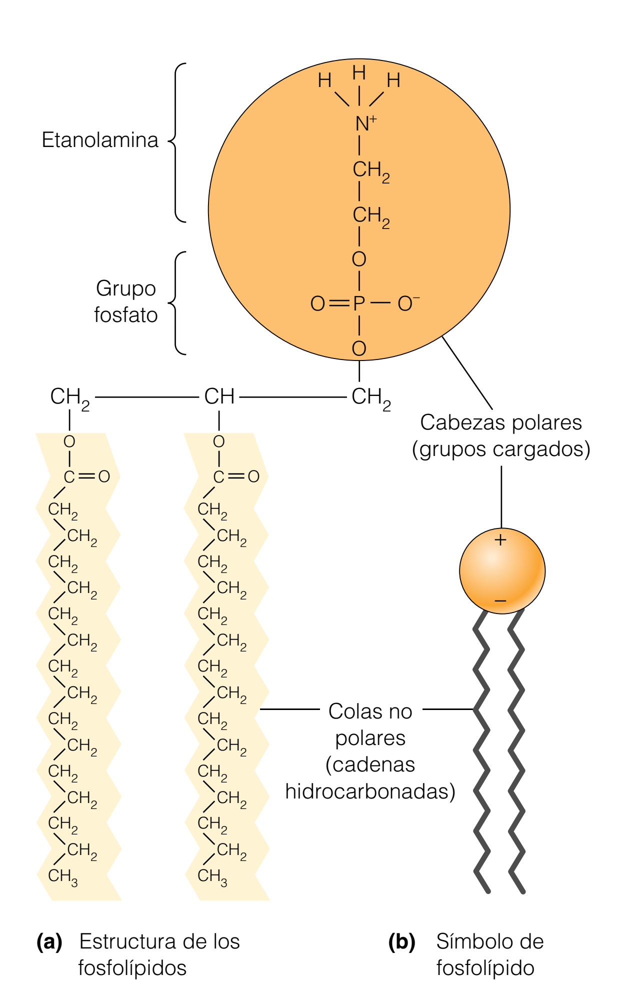


Figura 2.11 La naturaleza anfipática de los fosfolípidos de membrana. **(a)** Una molécula de fosfolípidos está formada por dos colas no polares (amarillas) y una cabeza polar (naranja). En la figura se muestra la fosfatidil etanilomina, un ejemplo de fosfolípido de membrana del grupo de los fosfoglicéridos. La polaridad de la cabeza de una molécula de fosfolípido deriva de un grupo fosfato cargado negativamente unido a un grupo cargado positivamente —un grupo amino, en el caso de la fosfatidil etanilomina—. Otros fosfoglicéridos comunes con un grupo fosfato y un grupo amino incluyen a la fosfatidil serina y la fosfatidil colina.**(b)** Una molécula de fosfolípido se representa esquemáticamente a menudo mediante un círculo para cabeza polar (observe la carga positiva y negativa) y líneas en zigzag para las cadenas hidrocarbonadas no polares.

fosfatidil etanolamina, un fosfolípido abundante en la mayoría de las membranas (fosfatidil etanolamina es un ejemplo se *fosfoglicérido*, la principal clase de fosfolípidos de membrana de la mayoría de las células. *Véase* la Figura 3.27 para más ejemplos de fosfoglicéridos y otras clases de fosfolípidos de membrana). La característica distintiva de los fosfolípidos anfipáticos es que cada molécula consiste en una «cabeza» polar y dos «colas» hidrocarbonadas no polares. La polaridad de la cabeza hidrofílica se debe a la presencia de un grupo fosfato cargado negativamente unido a un grupo con carga positiva, un grupo amino en el caso de la fosfatidil etanolamina y la mayoría de fosfoglicéridos.

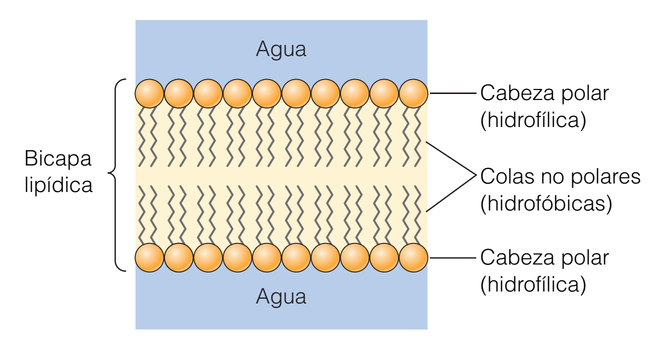
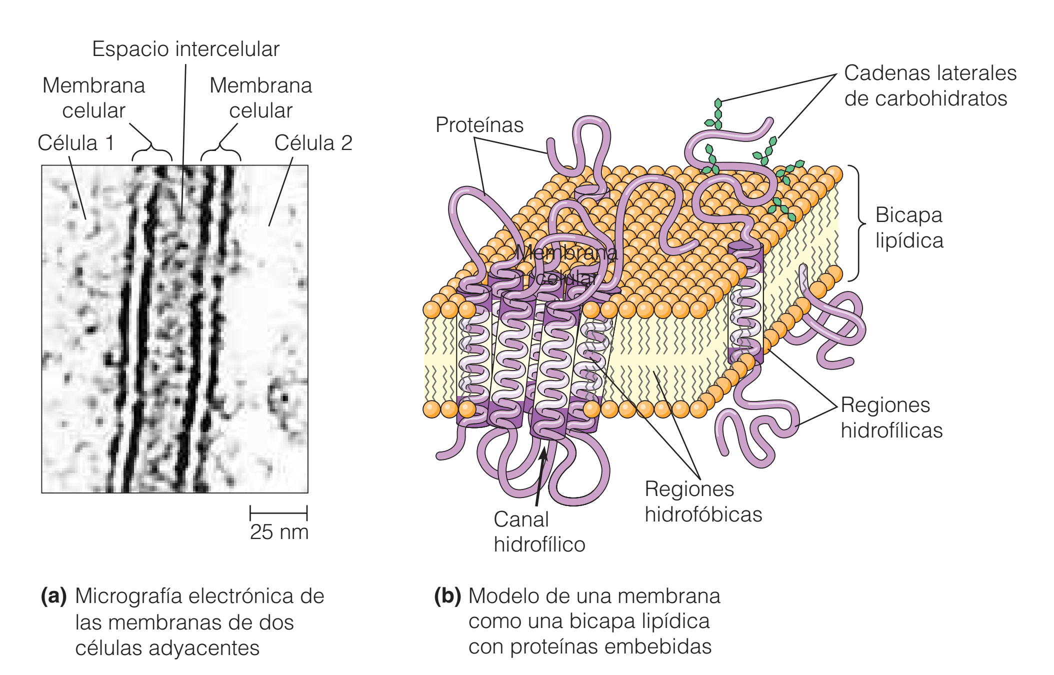


Figura 2.12 La bicapa lipídica como base de la estructura de la membrana. Debido a su naturaleza anfipática, los fosfolípidos en un medio acuoso se orientan formando una doble capa con las colas hidrofóbicas (grises) ocultas en la parte interior, y las cabezas hidrofílicas (naranja) orientadas hacia el medio acuoso de ambas caras de la membrana.

Una membrana es una bicapa lipídica con proteínas embebidas en ella

Cuando se expone a un medio acuoso, las moléculas anfipáticas experimentan interacciones hidrofóbicas. En una membrana, por ejemplo, los fosfolípidos se organizan en dos capas, con las cabezas polares orientadas hacia el medio acuoso externo de ambos lados y las colas hidrofóbicas escondidas del agua mediante interacciones con las colas de otras moléculas orientadas en la dirección opuesta. La estructura resultante es la **bicapa lipídica** mostrada en la Figura 2.12. Las cabezas de las dos capas se orientan hacia afuera y las colas hidrocarbonadas se extienden hacia adentro, formando la estructura interior hidrofóbica de la membrana.

Cada membrana biológica conocida tiene una bicapa lipídica como estructura básica. Cada uno de los lípidos tienealrededor de 3-4 nm de grosor, de forma que la bicapa tiene una anchura de alrededor de 7-8 nm. La bicapa lipídica confiere a las membranas su apariencia característica de «vía de tren» cuando se observa con el microscopio electrónico de transmisión (TEM; Figura 2.13 a). El osmio que se emplea para preparar el tejido para microscopía



(a) Micrografía electrónica de las membranas de dos células adyacentes

(b) Modelo de una membrana como una bicapa lipídica con proteínas embebidas

Figura 2.13 Membranas y estructura de membrana. (**a**) Las membranas celulares que rodean dos células adyacentes parecen un par de bandas oscuras en el microscopio electrónico. Esta apariencia característica trilaminar, o en «vía de tren», se cree que es debida a la asociación del osmio con las cabezas hidrofílicas de las moléculas de fosfolípidos y no con las colas hidrofóbicas como se muestra en esta micrografía electrónica (TEM). (**b**) Las membranas biológicas consisten en proteínas anfipáticas embebidas en una bicapa lipídica. Las proteínas se posicionan en la membrana de forma que las regiones hidrofóbicas (rosa claro) están localizadas en el interior hidrofóbico de la bicapa de fosfolípidos y sus regiones hidrofílicas (rosa oscuro) están expuestas al medio acuoso en cualquier superficie de la membrana. Las cadenas cortas unidas a la superficie superior a algunas de las proteínas de membrana representan cadenas laterales de carbohidratos.

electrónica reacciona aparentemente con las cabezas hidrofílicas de las moléculas de fosfolípidos en ambas superficies de la membrana, pero no con las colas hidrofóbicas en el interior de la membrana, lo que da a la membrana su apariencia *trilaminar* (tres capas).

En la Figura 2.13b se ilustra la estructura de las membranas biológicas. Diversas proteínas de membrana se encuentran embebidas dentro o asociadas a la membrana lipídica. Estas proteínas son casi siempre anfipáticas y se orientan en la bicapa lipídica de acuerdo con esto: las regiones hidrofóbicas de la proteína se asocian con el interior de la membrana, mientras que las regiones hidrofílicas sobresalen hacia el medio acuoso en cualquiera de las superficies de la membrana. Algunas proteínas de la membrana plasmática tienen cadenas laterales de carbohidratos unidas a sus superficies externas.

Dependiendo de la membrana en particular, las proteínas de membrana pueden desempeñar una o varias funciones. Algunas son *proteínas transportadoras*, responsables del movimiento de sustancias específicas a través de membranas impermeables. Otras son enzimas que catalizan reacciones asociadas con la membrana específica. Otras son receptores de la superficie externa de la membrana celular, *intermediarios del transporte de electrones* de la membrana mitocondrial, o proteínas de unión a la clorofila en los cloroplastos. En capítulos sucesivos nos encontraremos con cada uno de esos tipos de proteínas de membrana, comenzando en el Capítulo 4 (*véase* como ejemplo la Figura 4.9).

Las membranas son selectivamente permeables

Debido a su interior hidrofóbico, la membrana es realmente permeable a moléculas no polares, pero es relativamente impermeable a la mayoría de moléculas polares y muy impermeable a todos los iones. Ya que la mayoría de los constituyentes celulares son o bien polares o bien están cargados, tienen una afinidad escasa o nula por el interior de la membrana y así se evita eficazmente su entrada o salida de una célula o de un orgánulo. Sin embargo, las moléculas muy pequeñas son una excepción. Los compuestos con pesos moleculares por debajo de aproximadamente 100 difunden a través de las membranas independientemente de que sean no polares (como el O_2 y el CO_2) o polares (como el etanol y la urea). El agua es un ejemplo especialmente importante de una molécula muy pequeña, que aunque sea polar, difunde rápidamente a través de las membranas.

Por el contrario, incluso los iones más pequeños son excluidos eficazmente del interior hidrofóbico de la membrana. Por ejemplo, una bicapa lipídica es al menos 10^8 veces menos permeable a pequeños cationes como el Na^+ o el K^+ que al agua. Esta diferencia llamativa se debe tanto a la carga de los iones como a la esfera de hidratación que los rodea.

Por supuesto, resulta esencial el que las células tengan mecanismos para transferir iones como Na^+ y K^+ así como de una amplia diversidad de moléculas polares a través de las membranas, que serían de otra forma impermeables para estas sustancias. Como se ha mencionado ya, las membranas están equipadas con proteínas transportadoras que desempeñan esta función. Una proteína transportadora es una proteína transmembrana especializada, que sirve o bien como un *canal hidrofílico* a través de una membrana hidrofóbica, o como un transportador que se une a un soluto específico en una cara de la membrana y entonces sufre un cambio conformacional para mover el soluto a través de la membrana.

Tanto los canales como los transportadores son específicos para una molécula o un ion en particular (o, en algunos casos, para una clase de moléculas o iones muy relacionados). Además, la actividad de estas proteínas puede ser regulada cuidadosamente para satisfacer las necesidades de las células. Como resultado, las membranas biológicas se pueden describir como *selectivamente permeables*: con la excepción de las moléculas muy pequeñas, las únicas moléculas o iones que se pueden mover a través de una membrana en particular son aquellas para los cuales existen proteínas de transporte adecuadas en la membrana.

La importancia de la síntesis por polimerización

Las estructuras celulares como los ribosomas, cromosomas, membranas, flagelos y paredes celulares están compuestas mayoritariamente por conjuntos ordenados de polímeros lineales denominados **macromoléculas**. (Se producen ramificaciones en los acúmulos de almidón y glucógeno, pero los polímeros biológicos son generalmente lineales.) Como ejemplos de macromoléculas importantes en las células se incluyen las *proteínas*, los *ácidos nucleicos* (tanto el DNA como el RNA) y los *polisacáridos* como el almidón, el glucógeno y la celulosa. (Los *lípidos* se designan en algunas ocasiones como macromoléculas. Sin embargo, difieren en la forma en que se sintetizan de las otras clases de macromoléculas, y no se discutirán hasta el Capítulo 3.) Las macromoléculas son muy importantes tanto en la estructura como en la función de las células. La comprensión de las macromoléculas —cómo están hechas, cómo se ensamblan y cómo funcionan— es necesaria para comprender las bases bioquímicas de la biología celular.

Las macromoléculas son responsables de la forma en la función de los sistemas vivientes

La importancia las macromoléculas en biología celular está enfatizada por la jerarquía celular que se muestra en la Figura 2.14. Los compuestos de los que están hechas la mayoría de estructuras celulares son pequeñas *moléculas orgá-*

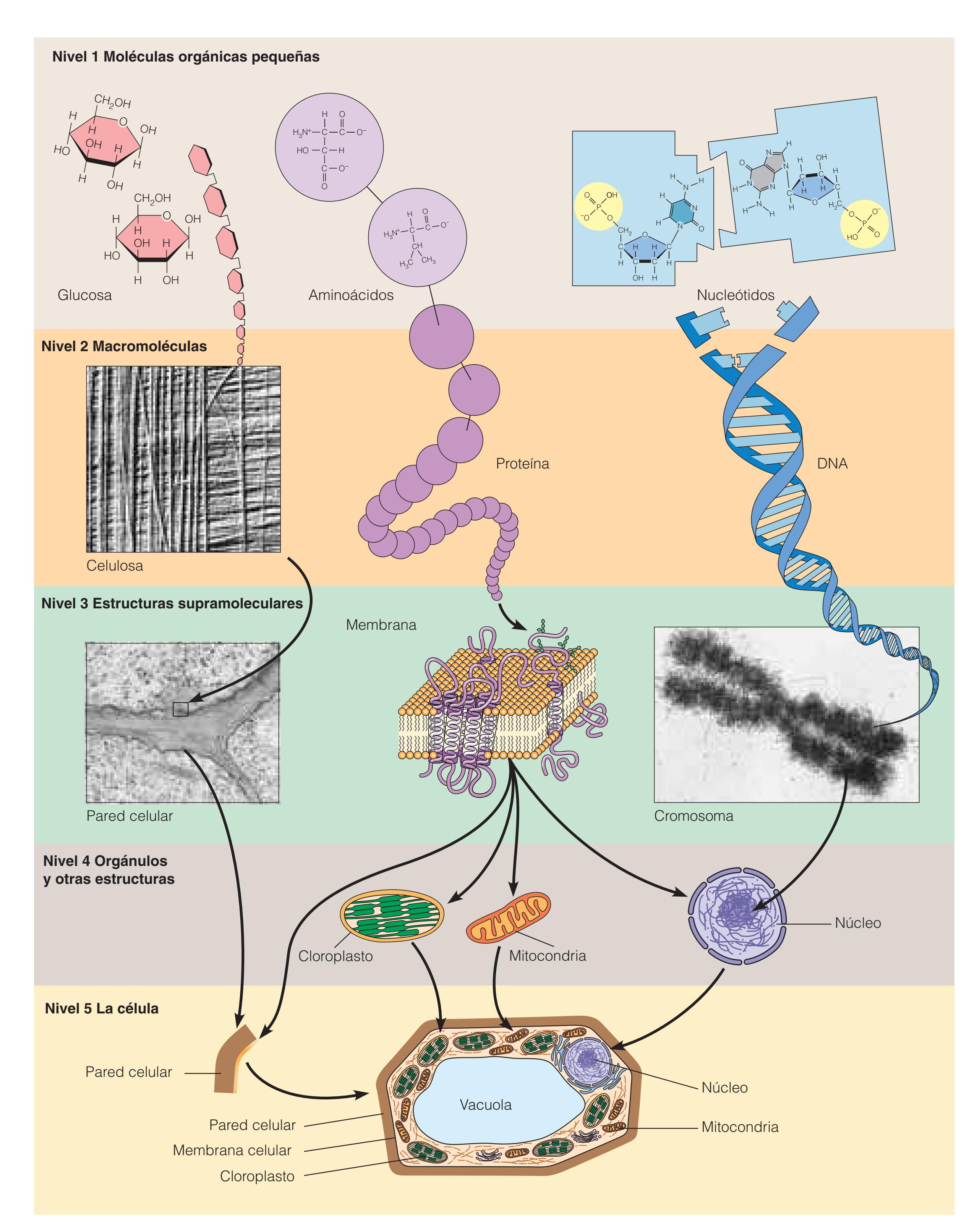


Figura 2.14 La naturaleza jerárquica de las estructuras celulares y de su ensamblaje. Las moléculas orgánicas pequeñas (nivel 1) se sintetizan a partir de sustancias simples inorgánicas y polimerizan para formar macromoléculas (nivel 2). Las macromoléculas se ensamblan entonces para formar estructuras supramoleculares (nivel 3) que forman parte de los orgánulos y otras estructuras celulares (nivel 4) y por último de la célula (nivel 5). (Las estructuras supramoleculares mostradas en el nivel 3 son más complejas en cuanto a su composición química que lo que sugiere esta figura. Por ejemplo, los cromosomas contienen proteínas además de DNA —de hecho aproximadamente en la misma proporción—. De forma similar, las membranas contienen no sólo proteínas sino también una amplia variedad de lípidos y las paredes celulares contienen no sólo celulosa, sino también otros carbohidratos y proteínas.)

nicas solubles en agua (nivel 1), que las células obtienen a partir de otras células o las sintetizan a partir de moléculas simples no biológicas como el dióxido de carbono, el amonio o los iones fosfato disponibles en el medio ambiente. Estas moléculas orgánicas polimerizan para formar macromoléculas biológicas (nivel 2) como polisacáridos, proteínas o ácidos nucleicos. Las macromoléculas se ensamblan para formar diversas *estructuras supramoleculares* (nivel 3), que constituyen los componentes de orgánulos y otras estructuras subcelulares (nivel 4) y por lo tanto de la propia célula (nivel 5).

Uno de los ejemplos de la Figura 2.14 es la biogénesis de una pared celular (izquierda). En las plantas, el polisacárido celulosa (nivel 2) es un componente mayoritario de la pared celular (nivel 3). La celulosa es a su vez un polímero repetitivo del azúcar simple glucosa (nivel 1), formado por la planta a partir de dióxido de carbono y agua en el proceso de fotosíntesis.

Para estos ejemplos emerge un principio general: *las macromoléculas que son responsables mayoritariamente de la forma y otras características de los sistemas vivientes son generadas por la polimerización de pequeñas moléculas orgánicas.* En la Figura 2.15, se ilustra esta estrategia de formar grandes moléculas por la unión de unidades más pequeñas de manera repetitiva. La importancia de esta estrategia difícilmente puede exagerarse, ya que es un principio fundamental de la química celular. Las enzimas responsables de la catálisis de reacciones celulares, los ácidos nucleicos implicados en el almacenamiento y en la expresión de información genética, el glucógeno almacenado en nuestro hígado y la celulosa que confiere rigidez a la pared celular, son todas variaciones del mismo diseño, cada una es una macromoléculas formada por la unión de pequeñas moléculas repetidas.

La *glucosa*, presente en la celulosa o el glucógeno, los aminoácidos necesarios para formar *proteínas,* y los *nucleótidos* de los que se componen los ácidos nucleicos son ejemplos de estas unidades repetidas o **monómeros.** En general, éstas son pequeñas moléculas orgánicas solubles en agua con pesos moleculares aproximadamente menores de 350. Se pueden transportar a través de la mayoría de membranas biológicas, ya que éstas tienen proteínas transportadoras adecuadas. Por el contrario, la mayor parte de macromoléculas que se sintetizan a partir de estos monómeros no pueden atravesar las membranas y por lo tanto se deben fabricar la célula o el compartimento en el que son necesarios. (Esta generalización es adecuada, aunque descubriremos numerosas excepciones a esta regla cuando nos encontremos, más adelante en el texto, con el RNA mensajero y las proteínas de algunos orgánulos.)

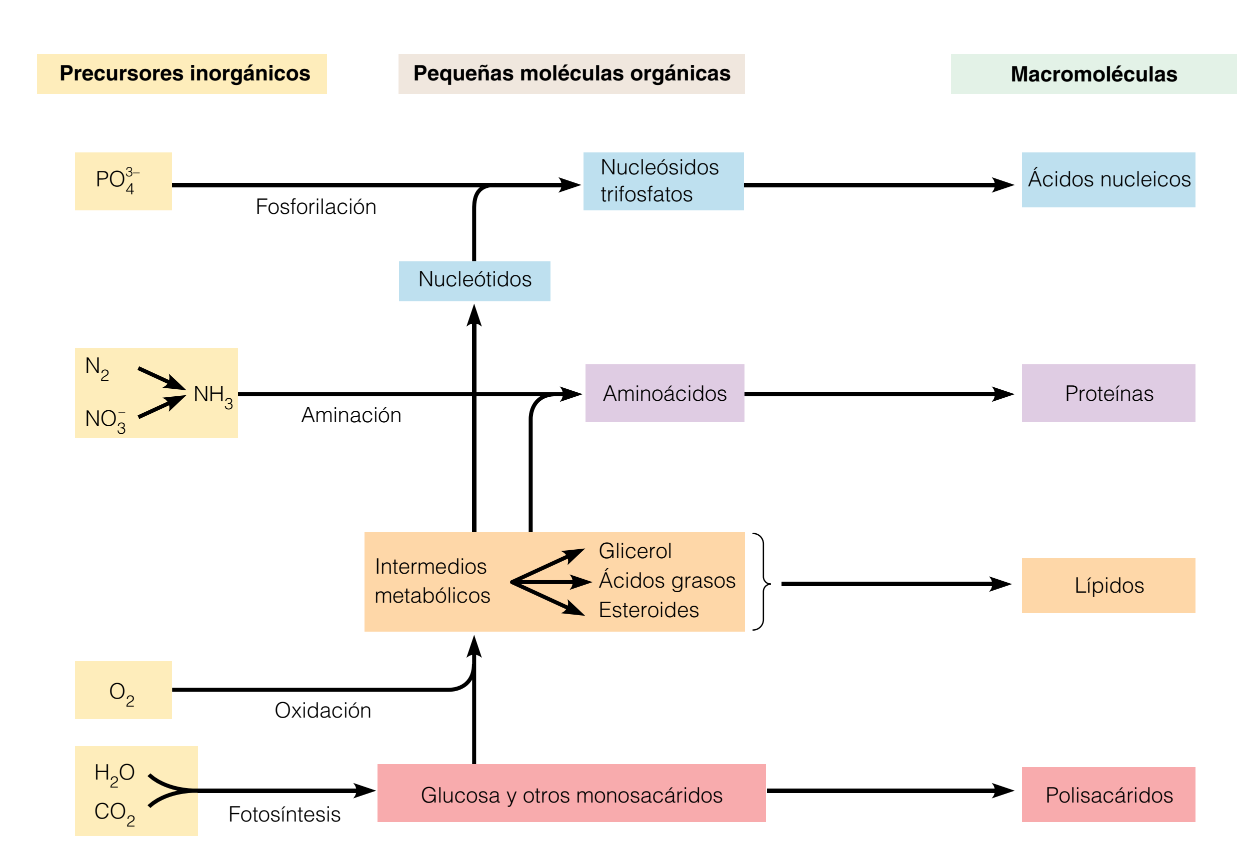


Figura 2.15 **La síntesis de las macromoléculas biológicas.** Los precursores inorgánicos simples (izquierda) reaccionan para formar pequeñas moléculas orgánicas (centro), que se emplean para la síntesis de macromoléculas (derecha) de las cuales están hechas la mayoría de estructuras celulares.

Las células contienen tres clases diferentes de macromoléculas

La Tabla 2.1 lista las principales clases de macromoléculas presentes en las células, junto con el número y la clase de subunidades monoméricas necesarias para la formación del polímero. La distinción entre *macromoléculas con información* y *macromoléculas estructurales y de almacenamiento* es importante ya que la función de estos polímeros biológicos afecta al número y al orden de monómeros diferentes que podemos esperar encontrar en ellos.

Los ácidos nucleicos (tanto DNA como RNA) y las proteínas se dominan **macromoléculas con información** ya que el orden de las distintas clases de subunidades diferentes que contienen no es al azar y es muy relevante para su función. El orden de los monómeros (nucleótidos en los ácidos nucleicos y aminoácidos en las proteínas) está determinado genéticamente y transporta información importante que especifica la función de estas macromoléculas.

Sin embargo, el término *información* se usa de forma diferente para los dos tipos de macromoléculas. Para una molécula de DNA o de RNA, la información inherente en su secuencia de nucleótidos sirve para la función de *codificación*, especificando la secuencia de aminoácidos de una proteína en particular. Para una proteína, la información presente en la secuencia de aminoácidos determina la estructura tridimensional de la proteína, de la cual depende su actividad biológica. La secuencia de aminoácidos en una proteína es tan importante que una variación en su secuencia probablemente tiene efectos deletéreos en la capacidad de esa proteína para desempeñar su función.

Para las macromoléculas con información, la polimerización de subunidades más pequeñas no es únicamente una forma económica de construir grandes moléculas sino que es una parte esencial en el papel que esas moléculas pueden desempeñar en la célula. Por ejemplo, la síntesis de ácidos nucleicos por la unión de pequeñas unidades repetidas (nucleótidos) es importante ya que el orden específico de estas unidades monoméricas es la información genética de la célula que estas moléculas almacenan y transmiten.

Por otro lado, los polisacáridos no son macromoléculas con información en el sentido en que lo son las proteínas y los ácidos nucleicos. La mayoría de los polisacáridos consisten o bien en una única unidad repetitiva (un monosacárido como la glucosa en la mayor parte de los casos) o en dos subunidades que se alternan estrictamente. Por tanto, el orden de los monómeros en un polisacárido no conlleva información y no es esencial para la función del polímero, como lo es en el caso de las proteínas o los ácidos nucleicos. La mayoría de polisacáridos son **macromoléculas de almacenamiento** o **macromoléculas estructurales**. Los polisacáridos de almacenamiento más conocidos son el *almidón* de las células vegetales y el *glucógeno* de las células animales. Como se muestra en la Figura 2.16a, ambos polisacáridos de almacenamiento están formados por un único monómero repetido, el azúcar simple o glucosa. (La principal diferencia entre el glucógeno y el almidón reside en la presencia o no de ramificaciones y en la cantidad de ellas, una característica que no se muestra en la Figura 2.16a, pero que trataremos en el Capítulo 3; *véase* la Figura 3.24 de la página 69).

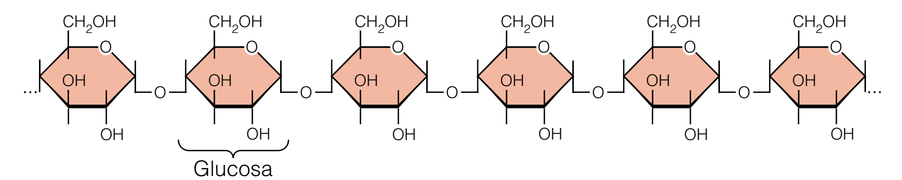
El ejemplo mejor conocido de un polisacárido estructural es la *celulosa* presente en la pared celular de las células vegetales. Como el almidón y el glucógeno, la celulosa también contiene unidades de glucosa, pero estas unidades están unidas por un enlace diferente, como veremos en el Capítulo 3. La pared celular de algunas células bacterianas contiene un tipo de polisacárido estructural más complicado. En este caso, la molécula consiste en dos clases diferentes de monómeros, N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido N-acetilmurámico (MurNAc) como se ilustra en la Figura 2.16b. Los dos monómeros se alternan estrictamente en la secuencia pero, sin embargo, no portan información. Un ejemplo adicional de un polisacárido estructural es la *quitina*, presente en el exoesqueleto de los insectos y en la cubierta de los crustáceos. La quitina está formada únicamente por unidades de GlcNAc.

Las macromoléculas se sintetizan por polimerización gradual de monómeros

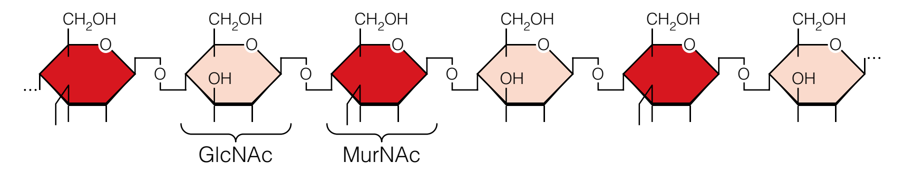
En el Capítulo 3, atenderemos a cada una de las principales clases de macromoléculas biológicamente importantes. Sin embargo, en primer lugar sería útil considerar diversos principios importantes que subyacen al proceso de polimerización mediante el cual se originan estas macromo-

Tabla 2.1 Macromoléculas con importancia biológica y sus unidades repetidas

	Polímero biológico			
	Proteínas	**Ácidos nucleicos**	**Polisacáridos**	
Clase de macromolécula	Con información	Con información	De almacenamiento	Estructural
Ejemplos	Enzimas, hormonas, anticuerpos	DNA, RNA	Almidón, glucógeno	Celulosa
Monómeros repetidos	Aminoácidos	Nucleótidos	Monosacáridos	Monosacáridos
Número de clases de unidades de repetición	20	4 en DNA; 4 en RNA	Uno o pocos	Uno o pocos



(a) Un polisacárido de almacenamiento (segmento de la molécula de almidón o de glucógeno)



(b) Un polisacárido estructural (segmento de un componente de la pared celular bacteriana)

Figura 2.16 Macromoléculas de almacenamiento y estructurales. Las macromoléculas de almacenamiento y estructurales contienen una o pocas clases de unidades repetidas en una secuencia estrictamente repetida. (**a**) Una parte de la secuencia de un segmento lineal en el polisacárido de almacenamiento de almidón o glucógeno consiste en unidades de glucosa unidas por enlaces glicosídicos. (**b**) Una parte de la secuencia del polisacárido de la pared celular que consiste en la estricta alternancia de los derivados de azúcares *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido *N*-acetilmurámico (MurNAc). (*Véase* en las Figuras 3.22, 3.24 y 3.26 para representaciones más detalladas de la glucosa, almidón, glucógeno, GlcNAc, MurNAc, y un polisacárido de la pared celular.)

léculas. Aunque la química de las unidades monoméricas y, por tanto, de los polímeros resultantes, difiere bastante entre macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos, los siguientes principios básicos se aplican en todos los casos:

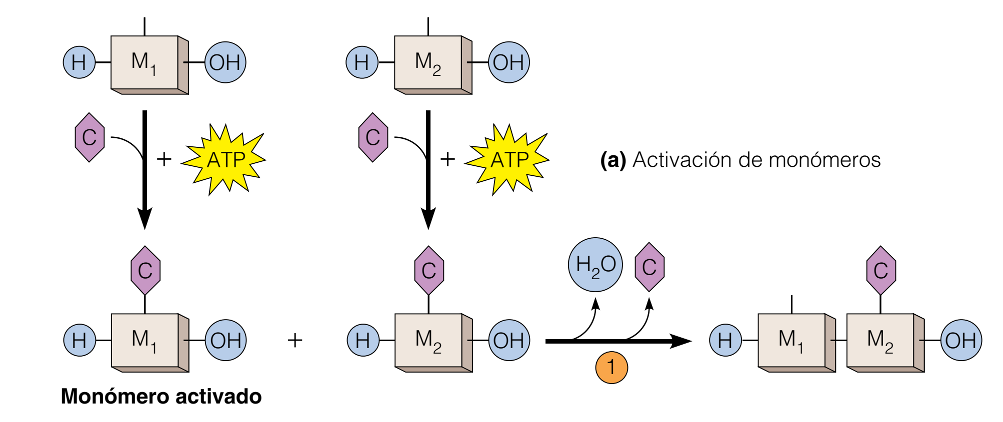
1. Las macromoléculas son siempre sintetizadas mediante polimerización gradual a partir de pequeñas moléculas semejantes o idénticas denominadas *monómeros.*
2. La adición de cada unidad monomérica se produce mediante la eliminación de una molécula de agua y por lo tanto se denomina una **reacción de condensación**.
3. Las unidades monoméricas que se van a unir deben estar presentes como monómeros activados antes de que pueda ocurrir la condensación.
4. La activación implica normalmente el acoplamiento de los monómeros a algún tipo de **molécula transportadora** para constituir monómeros activados.
5. La energía para acoplar el monómero a la molécula transportadora es cedida por una molécula denominada adenosina trifosfato (*ATP*; *véase* la Figura 3.16 para su estructura) o algún compuesto de alta energía relacionado.
6. Debido a la forma en que se sintetizan las macromoléculas, éstas tienen una **direccionalidad** inherente que consiste en que los dos extremos de la cadena del polímero son químicamente diferentes.

Debido a que la eliminación de agua es esencial para todas las reacciones de polimerización biológica, cada monómero debe contener un hidrógeno (H) reactivo en al menos un grupo funcional y un grupo hidróxido reactivo (—OH) en alguna otra zona de la molécula. Esta característica estructural se muestra esquemáticamente en la Figura 2.17a, que representa las unidades monoméricas (M) simplemente como cajas pero que indica el hidrógeno reactivo y el grupo hidróxido en cada una. Para un tipo dado de polímero, los monómeros pueden diferenciarse en otros aspectos de su estructura —de hecho, deben ser diferentes si el polímero es una macromolécula con información—, pero cada monómero posee el mismo tipo de hidrógeno reactivo y del grupo hidróxido.

La Figura 2.17a también nuestra la activación de los monómeros, un proceso que requiere energía. Independientemente de la naturaleza del polímero, la adición de cada monómero a una cadena en crecimiento es siempre energéticamente desfavorable, a no ser que el monómero que se incorpora sea una forma activada y cargada de energía. La activación implica el acoplamiento del monómero a algún tipo de molécula transportadora (C) y el ATP o por un compuesto de alta energía relacionado cede la energía necesaria para dirigir el proceso de activación. Para cada tipo de polímero se usa un tipo diferente de molécula transportadora. En la síntesis de proteínas, los aminoácidos se activan mediante la unión a transportadores denominados RNA de transferencia (o *tRNA*), mientras que los polisacáridos se sintetizan a partir de una molécula de azúcares (a menudo glucosa) que se activan mediante su unión a derivados de nucleótidos (*adenosina difosfato* para el almidón, *uridina difosfato* para el glucógeno).

Una vez activados, los monómeros son capaces de reaccionar entre ellos, en una reacción de condensación que va seguida o acompañada por la liberación de la molécula transportadora de uno de los dos monómeros (Figura 2.17b). El alargamiento posterior del polímero es un proceso secuencial y escalonado mediante la adición secuencial de monómeros activados que alargan el polímero paso a paso. La Figura 2.17c ilustra los *n* pasos de este proceso, en el que se añade una unidad monomérica a un polímero que ya contiene *n* unidades.

La naturaleza química de los monómeros de alta energía, del transportador y del propio proceso de activación difieren para cada polímero biológico, pero el principio



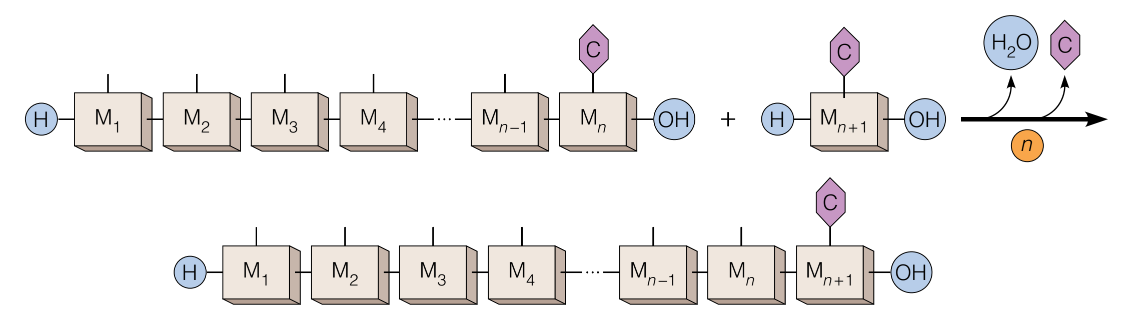


Figura 2.17 **Síntesis de macromoléculas.** Las macromoléculas biológicas se sintetizan en un proceso y esto implica la activación de unidades monoméricas seguidas por su adición secuencial a la cadena del polímero en crecimiento. Dependiendo del polímero, todos los monómeros pueden ser idénticos (por ejemplo, las unidades de glucosa en el almidón y el glucógeno) o pueden ser diferentes entre ellas (los aminoácidos en las proteínas o los nucleótidos en los ácidos nucleicos), pero el proceso de polimerización es el mismo conceptualmente en cada caso. (**a**) Los monómeros (M_1, M_2, etc.) con grupos reactivos H y OH (mostrados en azul) son activados por el acoplamiento a una molécula transportadora (C, mostrado en púrpura), empleando energía cedida por el ATP, un compuesto semejante de alta energía. (**b**) El primer paso en la síntesis de un polímero implica la condensación de los monómeros activados acompañada o seguida por la liberación de una de las moléculas transportadoras. (**c**) El paso *n* en el proceso de polimerización implica la adición del siguiente monómero activado siguiente (M_{n+1}) a un polímero que consiste en *n* unidades monoméricas, con la liberación de la molécula transportadora unida a la unidad *n*.

general es siempre el mismo: *la síntesis del polímero siempre implica a monómeros activados y ATP o un compuesto similar de alta energía requerido para activar los monómeros mediante su unión a una molécula transportadora apropiada.*

La importancia del autoensamblaje

Hasta el momento hemos estudiado cómo las macromoléculas, que caracterizan a la organización y a la función biológica, son polímeros de pequeñas moléculas orgánicas hidrofílicas. Los únicos requerimientos para la polimerización consisten en proporcionar adecuadamente las unidades monoméricas, una fuente de energía, y en el caso de las proteínas y que los ácidos nucleicos, la suficiente información para especificar el orden en el que las unidades (aminoácidos o nucleótidos) se adicionan. Todavía hay que considerar algunos pasos posteriores —los procesos a través de los cuales se organizan estas macromoléculas en agregados supramoleculares y orgánulos reconocibles como estructuras celulares—. En otras palabras, en términos de la Figura 2.14, necesitamos preguntarnos cómo las macromoléculas de nivel 2 se ensamblan para formar estructuras de los niveles superiores 3, 4 y 5.

El principio de **autoensamblaje**, que afirma que *la información requerida para especificar el plegamiento de las macromoléculas y sus interacciones para formar estructuras más complicadas con funciones biológicas específicas es inherente a los propios polímeros.* Es crucial para nuestra comprensión de las estructuras que se dé en niveles superiores. Este principio establece que, una vez que se han sintetizado las macromoléculas en la célula, su ensamblaje en estructuras más complejas ocurre espontáneamente sin necesidad de energía o información adicional. Como veremos en breve, este principio ha sido de alguna forma respaldado por la observación de que las proteínas denominadas chaperonas son necesarias en algunos, e incluso en

muchos, casos de plegamiento de proteínas, para prevenir interacciones moleculares incorrectas que podrían conducir a estructuras inactivas. Sin embargo, incluso en estos casos, las moléculas de chaperonas no proporcionan información estérica adicional; simplemente colaboran en el proceso de ensamblaje inhibiendo las interacciones que podrían producir estructuras incorrectas.

Muchas proteínas se autoensamblan

Un prototipo útil para la comprensión del proceso de autoensamblaje es el enrollamiento y plegamiento necesario para formar una proteína tridimensional funcional a partir de una o varias cadenas de aminoácidos. Aunque en la distinción no se hace siempre correctamente, el producto inmediato de la polimerización de aminoácidos no es una proteína, sino un **polipéptido**. Para transformarse en una proteína funcional, uno o más de estas cadenas polipeptídicas lineales se deben enrollar y plegar de una manera muy precisa y predeterminada, para asumir una estructura tridimensional única necesaria para la actividad biológica.

Las evidencias para el autoensamblaje de proteínas proceden en gran medida a partir de estudios en los que la estructura *nativa* o natural de una proteína es destruida al cambiar las condiciones del medio. Esta desestructuración o desplegamiento se puede conseguir elevando la temperatura, haciendo que el pH de una solución sea altamente ácido o alcalino, o adicionando algunos agentes químicos como la urea o diversos alcoholes. El desplegamiento de un polipéptido bajo estas condiciones se denomina desnaturalización, porque conduce a la pérdida de la estructura tridimensional natural de la proteína —y también de su función, como por ejemplo la pérdida de la actividad catalítica en el caso de una enzima—.

Cuando el polipéptido desnaturalizado retorna a las condiciones en las que la estructura nativa es estable, el polipéptido puede sufrir una **renaturalización**, es decir el retorno a su estructura tridimensional correcta. Al menos en algunos casos, la proteína renaturalizada adquiere de nuevo su función biológica —actividad catalítica en el caso de una enzima.

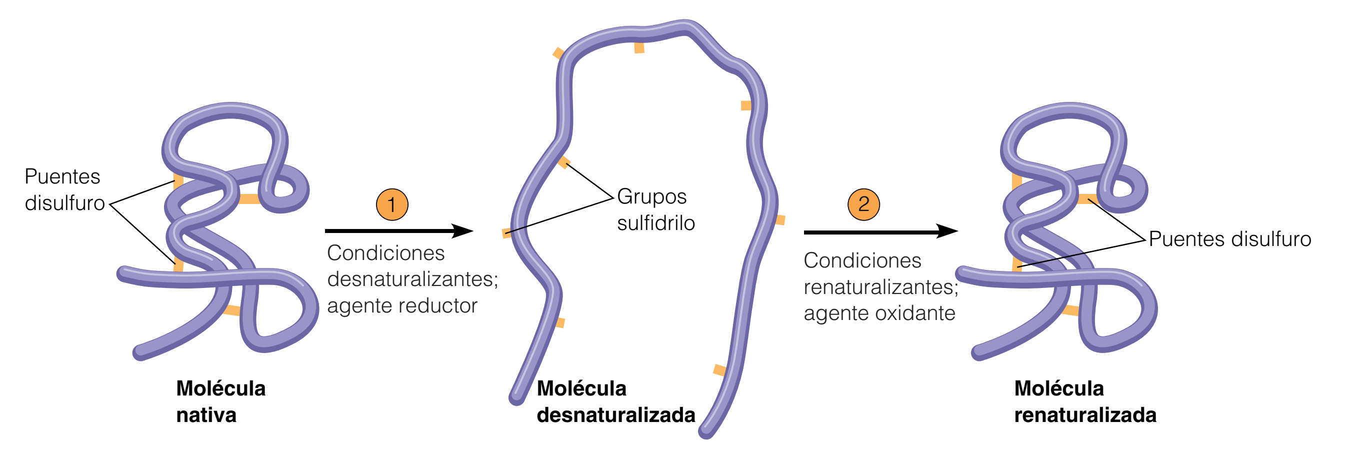
La Figura 2.18a muestra la desnaturalización y posterior renaturalización de la *ribonucleasa*, la proteína empleada por Christian Anfinsen y sus colaboradores en sus estudios clásicos del autoensamblaje de proteínas. ① Cuando una solución de ribonucleasa se calienta, la proteína se desnaturalizará produciendo un polipéptido desplegado y enrollado al azar, con libertad de rotación en los enlaces covalentes, tanto en la cadena polipeptídica como en los grupos funcionales de varios aminoácidos. En este estado, la ribonucleasa no tiene forma fija y ni actividad catalítica. ② Si la solución de las moléculas desnaturalizadas se enfría lentamente, las moléculas de ribonucleasa adquirirán de nuevo su forma original y tendrán otra vez actividad catalítica. Por lo tanto, toda la información necesaria para especificar la estructura tridimensional de la molécula de ribonucleasa es inherente a su secuencia de aminoácidos. Se han obtenido resultados similares de desnaturalización/renaturalización en experimentos con otras proteínas y con estructuras que contienen proteínas, aunque la renaturalización con proteínas más grandes y complejas es mucho más difícil y algunas veces imposible.

Obsérvese que las condiciones para la desnaturalización de la ribonucleasa (Figura 2.18a, ①) incluyen no sólo calor sino también la presencia de un agente reductor. El agente reductor es necesario ya que la ribonucleasa contiene el aminoácido cisteína en ocho posiciones a lo largo de la cadena politécnica, y cada cisterna tiene un grupo sulfidrilo (—SH) capaz de formar *enlaces covalentes disulfuro* (—S—S—), mediante la reacción oxidativa con el grupo sulfidrilo de otra cisteína en cualquier lugar de la cadena polipeptídica. Como se indica en la Figura 2.18a, la molécula de ribonucleasa nativa tiene cuatro enlaces disulfuro que confieren estabilidad adicional a la estructura. Para generar una molécula completamente desnaturalizada, es necesario un agente para reducir los puentes disulfuro a grupos sulfidrilo libres. Para renaturalizar la molécula es necesario un agente oxidante para reconstruir los puentes disulfuro. Cada enlace disulfuro de la molécula renaturalizada se forma por los dos mismos grupos sulfidrilo que constituyen un puente disulfuro en la molécula original no desnaturalizada, incluso aunque las cisteínas estén alejadas en la cadena polipeptídica.

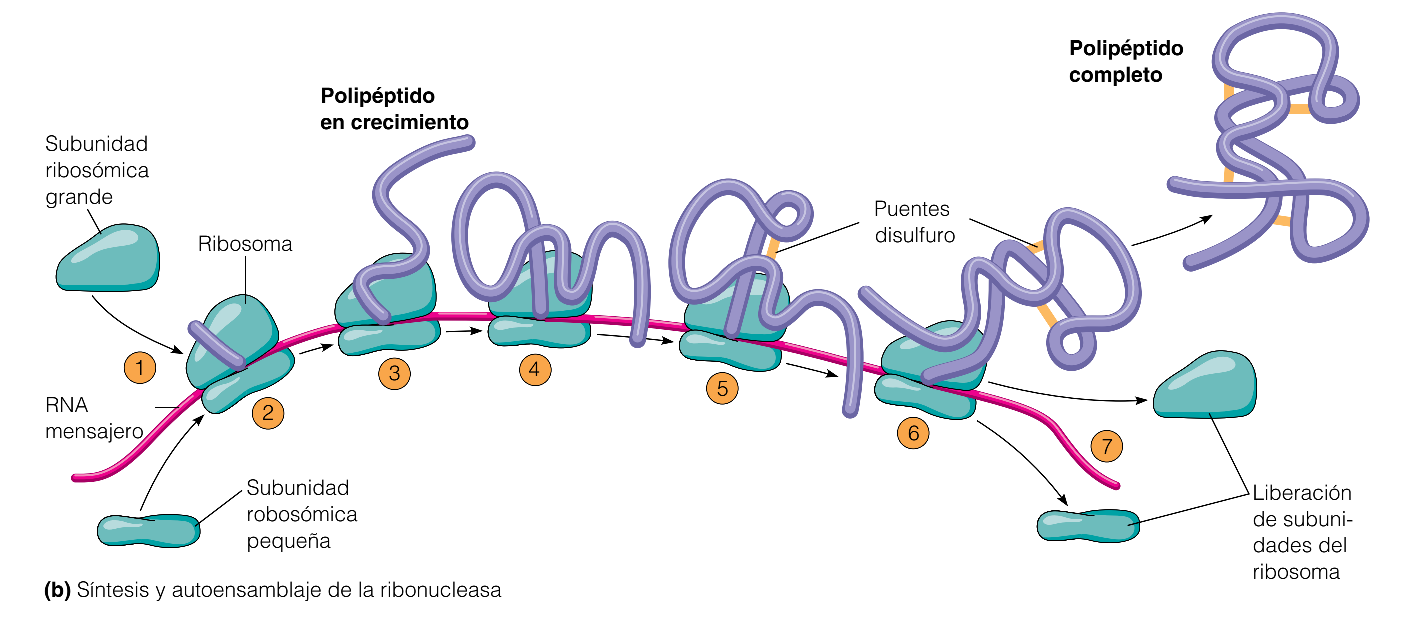
Las chaperonas participan en el ensamblaje de algunas proteínas

En base a la capacidad de algunas proteínas desnaturalizadas de volver a su configuración original y de recobrar su función biológica, los biólogos asumieron inicialmente que las proteínas, y las estructuras que contienen proteínas, se pueden ensamblar igualmente en las células. Como se ilustra en la Figura 2.18b para la ribonucleasa, la síntesis de proteínas tiene lugar en los ribosomas. El polipéptido se alarga al irse añadiendo sucesivamente aminoácidos hasta el final. El modelo de autoensamblaje prevé el enrollamiento y el plegamiento espontáneo de las cadenas polipeptídicas al tiempo que se sintetizan los polipéptidos.

En el momento en que un polipéptido completo es liberado del ribosoma se considera que ha logrado una estructura tridimensional estable y predecible, sin ningún aporte de energía o de información más allá del proceso básico de polimerización. Además, se considera que el plegamiento es único, en el sentido de que cada polipéptido con la misma secuencia de aminoácidos se celebrará de una forma idéntica y reproducible bajo las mismas condiciones. Por lo tanto, el modelo del autor salvaje asume que las interacciones que ocurren dentro y entre polipéptidos constituyen todo lo que es necesario para la biogénesis de proteínas en sus formas funcionales.



(a) Desnaturalización y renaturalización de la ribonucleasa



(b) Síntesis y autoensamblaje de la ribonucleasa

Figura 2.18 Espontaneidad del plegamiento de un polipéptido. (**a**) Para demostrar que la información para la configuración tridimensional de un polipéptido reside en su secuencia de aminoácidos, se puede exponer el polipéptido intacto a condiciones desnaturalizantes. ① La proteína que se muestra es la ribonucleasa, formada por una cadena polipeptídica sencilla. En el experimento original de Anfisen con ribonucleasa se empleó calor como agente desnaturalizante, pero se pueden emplear también diversos agentes químicos. Este tratamiento produce una molécula desnaturalizada que carece de forma fija y que ha perdido la función biológica (actividad enzimática en el caso de la ribonucleasa). ② Mediante el retorno a las condiciones que permiten volver a la estructura original (enfriamiento gradual o eliminación del agente desnaturalizante), el polipéptido vuelve espontáneamente a tener la configuración nativa (renaturalización) sin el requerimiento de información adicional. (Para polipéptidos como la ribonucleasa, en los que la configuración nativa de la molécula está estabilizada por puentes disulfuro [—S—S—], la desnaturalización completa requiere la utilización de un agente reductor para reducir los puentes disulfuro a los grupos sulfidrilo [—SH] que los componen. Cuando el polipéptido se renaturaliza se requiere un agente oxidante para recomponer los puentes disulfuro.) (**b**) Se considera que las mismas interacciones que aseguran el retorno de un polipéptido desnaturalizado a su forma nativa actúan durante su síntesis en un ribosoma para asegurar el enrollamiento y plegamiento progresivo del polipéptido en su configuración tridimensional característica. En este dibujo de la síntesis el polipéptido ribonucleasa se inicia a la izquierda de forma que los ribosomas de izquierda a derecha tienen completada una porción mayor de la cadena polipeptídica.

Sin embargo, este modelo de autoensamblaje in vivo (en la célula) se basa enteramente en estudios con proteínas aisladas, e incluso bajo condiciones de laboratorio no todas las proteínas adquieren de nuevo su estructura nativa. En base a su trabajo con una proteína (*ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa*, la enzima multimérica de los cloroplastos que cataliza la fijación de CO_2 en el proceso de fotosíntesis), John Ellis y sus colaboradores en la Universidad de Warwick concluyeron que el modelo del autoensamblaje, al menos en su formulación más simple, puede no ser adecuado para todas las proteínas. En muchos casos, las interacciones que conducen al plegamiento de las pro-

teínas necesitan ser asistidas y controladas para reducir la probabilidad de la formación de estructuras incorrectas sin actividad biológica. Este sistema de control puede no ser necesario en procesos de ensamblaje con una probabilidad baja de interacciones incorrectas y de estructuras no funcionales (como es probablemente el caso del plegamiento de la ribonucleasa, proteína compuesta por una única cadena polipeptídica). Para procesos más complejos (como el ensamblaje de la ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa a partir de sus 16 subunidades), el control es esencial para producir un número suficiente de estructuras correctas que cubran las necesidades celulares.

Este control de los procesos complejos de ensamblaje se lleva a cabo por proteínas preexistentes denominadas **chaperonas**, que facilitan el ensamblaje correcto de proteínas, y estructuras que contienen proteínas, pero que no son componentes de las propias estructuras ensambladas. Las chaperonas que han sido identificadas hasta hoy no confieren información para el plegamiento del polipéptido o para el ensamblaje de múltiples polipéptidos en una proteína única. Por el contrario, funcionan uniéndose a residuos estructurales específicos que están expuestos únicamente en etapas tempranas del ensamblaje y así inhibiendo las vías de ensamblaje no productivas que podrían conducir a estructuras incorrectas. Comentando el término chaperona, Ellis y Van der Vies observaron que «el término chaperonas[2] es apropiado para el ensamblaje de proteínas ya que el papel de la chaperona humana es prevenir las interacciones incorrectas entre la gente, y no proveer información estérica para esas interacciones» (Ellis y Van der Vies, 1991, p. 323).

El modo de acción de las chaperonas se puede describir óptimamente como el **autoensamblaje asistido**. Podemos por lo tanto distinguir dos tipos de autoensamblaje: el *autoensamblaje estricto*, en el que para el plegamiento correcto no son necesarios factores distintos a la propia estructura del polipéptido; y el *autoensamblaje asistido*, en el que para asegurar que el plegamiento correcto es necesaria una chaperona apropiada.

La lista de chaperonas conocidas ha crecido de manera sostenida desde que Ellis y sus colaboradores propusieron inicialmente el término en 1987. Las primeras chaperonas estudiadas fueron las de los cloroplastos, mitocondrias y bacterias. Sin embargo, en unos pocos años se han identificado chaperonas en otras localizaciones en eucariontes. Las chaperonas son abundantes en condiciones normales y sus niveles se incrementan en respuesta a agentes estresantes, como el incremento en la temperatura —una condición denominada *choque de calor*— o el incremento en el contenido celular de proteínas no plegadas. Muchas de las chaperonas más comunes se agrupan en dos familias denominadas *Hsp60* y *Hsp70*. («Hsp» se refiere a proteína de choque de calor —del inglés *heat-shock protein*— y los números se refieren al peso molecular aproximado de los monómeros polipeptídicos de las proteínas —60.000 y 70.000 respectivamente—. Las proteínas dentro de cada familia Hsp están relacionadas evolutivamente, y se han encontrado en todo el mundo biológico. Por ejemplo, las proteínas Hsp70 se han encontrado en bacterias y en células de una amplia variedad de eucariontes, en los que están presentes en numerosas localizaciones intracelulares.

Además de su papel en el plegamiento de polipéptidos recién sintetizados, las chaperonas tienen otras funciones. Algunas de éstas se relacionan con la actividad de proteínas en la célula y otras con el transporte de proteínas a orgánulos (*véase* Capítulo 22). Una clase importante de chaperonas, las *nucleoplasminas* son proteínas nucleares que desempeñan una variedad de funciones durante los procesos nucleares de replicación y transcripción del DNA, el procesamiento del RNA y el transporte de estas moléculas dentro y fuera del núcleo.

Las uniones e interacciones no covalentes son importantes en el plegado de macromoléculas

Tanto si el proceso está dirigido o no por chaperonas, los polipéptidos se pliegan y se autoensamblan sin el aporte de energía o información adicional, y la estructura tridimensional de una proteína es llamativamente estable una vez que se obtiene. Para comprender el autoensamblaje de las proteínas (y de otras moléculas y estructuras biológicas) necesitamos considerar los enlaces covalentes y no covalentes que mantienen unidos los polipéptidos y otras macromoléculas.

Los *enlaces covalentes* son fáciles de comprender. Cada proteína u otras macromoléculas en la célula se mantienen unidas por enlaces covalentes fuertes como los que se han discutido previamente en este capítulo. Un enlace covalente se forma cuando dos átomos comparten electrones, más que ganarlos o perderlos completamente. El compartir electrones es una característica especialmente prominente en el átomo de carbono, que tiene cuatro electrones en su orbital más externo y está por lo tanto en un punto intermedio entre la tenencia a ganar o perder electrones.

Los enlaces covalentes no sólo unen los monómeros de un polipéptido, sino que también estabilizan la estructura tridimensional de muchas proteínas. Específicamente, los enlaces covalentes disulfuro (—S—S—) desempeñan un papel importante en la estructura proteica. Considere, por ejemplo, la molecula ribonucleasa de la Figura 2.18. Como se apuntó anteriormente, esta molécula contiene el aminoácido cisteína en ocho posiciones a lo largo la cadena polipeptídica. Cada cisteína tiene un grupo sulfidrilo libre que puede formar un enlace disulfuro mediante la reacción con el grupo sulfidrilo de otra cisteína localizada en cualquier otro punto a lo largo de la cadena polipeptídica. La

[2] *N. del T.:* Chaperon en inglés hace referencia a una persona acompañante o «carabina».

molécula de ribonucleasa nativa tiene cuatro puentes disulfuro que confieren estabilidad a la estructura la molécula. Muchas proteínas están estabilizadas de esta forma por puentes disulfuro, tanto dentro de un único polipéptido como entre polipéptidos monoméricos de una proteína multimérica.

A pesar de la importancia de los enlaces covalentes en la química celular, la complejidad de la estructura molecular no se puede describir únicamente en términos de enlaces covalentes. La mayoría de las estructuras de la célula se mantienen unidas por interacciones mucho más débiles, **los enlaces e interacciones no covalentes** dentro y entre proteínas y otras moléculas.

Los enlaces e interacciones no covalentes más importantes en las macromoléculas biológicas son los puentes de hidrógeno, los puentes iónicos, las interacciones de van der Waals y las interacciones hidrofóbicas. Cada una de esas interacciones se introduce aquí pero se discutirán con mayor detalle en el Capítulo 3 (*véase* Figura 3.5). Como ya hemos indicado, los *puentes de hidrógeno* implican interacciones atractivas débiles entre un átomo de hidrógeno que está unido covalentemente a un átomo electronegativo y un segundo átomo electronegativo. Los *puentes iónicos* son interacciones electrostáticas no covalentes entre dos iones cargados opuestamente. En el caso de las macromoléculas éstos son grupos funcionales cargados positiva o negativamente como los grupos amino, carboxilo y fosfato.

Las interacciones (o fuerzas) de van der Waals son interacciones atractivas débiles entre dos átomos que se deben a separaciones transitorias de carga (llamada *dipolos*) en ambos átomos. Estas interacciones se observan únicamente si los átomos están muy próximos y orientados apropiadamente. El término *interacciones hidrofóbicas* denota la tenencia de grupos no polares dentro de una macromolécula a asociarse entre ellos, minimizando de esta forma su contacto con las moléculas de agua que los rodean y con los grupos hidrofílicos de la misma (o incluso de otra) macromolécula.

Cada uno de estos enlaces son interacciones que tienden a mantener unidas partes de una macromolécula, pero cuando los átomos, o los grupos de átomos, se acercan demasiado comienzan a repelerse debido al solapamiento de los orbitales de sus electrones más externos. El radio de van der Waals de un átomo o un grupo funcional hace referencia al «espacio privado» alrededor suyo y establece el límite de cuánto se pueden acercar otros átomos o grupos antes de ser repelidos. Los radios de van der Walls que separan los átomos más comunes en las moléculas biológicas (H, O, N, C, S y P) están en el rango de 0,12 a 0,19 nm. Los radios de van der Walls establecen las bases para los *modelos de ocupación del espacio* de las macromoléculas biológicas, como en el caso de la proteína insulina mostrado en la Figura 2.19 y de la molécula de DNA de la Figura 3.19b.

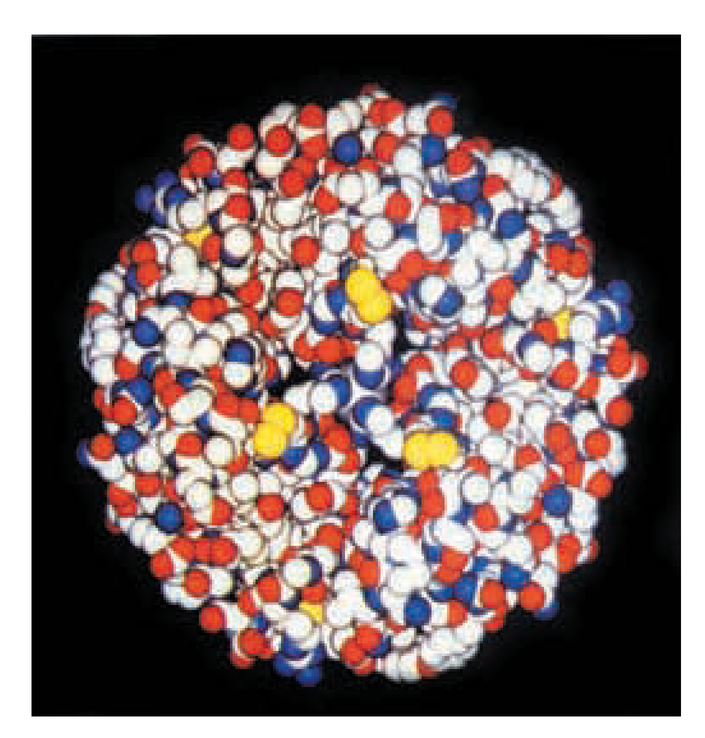


Figura 2.19 **Modelo de ocupación espacial de una proteína.** Todos los átomos y grupos químicos de este modelo de la proteína insulina se representan como esferas con los radios de van der Waals adecuados. Obsérvese el estrecho agrupamiento de los átomos. (Código de color: C = rojo, H = blanco, O = azul y S = amarillo.)

El autoensamblaje también ocurre en otras estructuras celulares

El mismo principio de autoensamblaje que rige el plegamiento en las interacciones de los polipéptidos se produce también en estructuras celulares más complejas. Muchas de las estructuras características de la célula son complejos de dos o más clases diferentes de polímeros y por lo tanto claramente implican interacciones diferentes químicamente del plegamiento y la asociación de cadenas polipeptídicas. Sin embargo, el principio de autoensamblaje es aún válido. Por ejemplo, los *ribosomas* contienen RNA y proteínas, y las *membranas* están construidas con fosfolípidos y proteínas que ya hemos descrito. Incluso la *pared celular primaria* que rodea una célula vegetal, aunque principalmente está compuesta por fibrillas de celulosa, también contiene una amplia variedad de otros carbohidratos, así como un componente proteico pequeño pero aparentemente crucial. A pesar de las diferencias químicas entre polímeros tan diversos como proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos, las interacciones que mantienen estos agregados supramoleculares parecen ser esencialmente las mismas que las que dictan el plegamiento de moléculas individuales de proteínas.

El virus del mosaico del tabaco es un buen ejemplo de autoensamblaje

Algunas de las observaciones más concluyentes respecto al autoensamblaje de estructuras biológicas completas proceden de estudios con virus. Como aprenderemos en el Capítulo 4, un *virus* es un complejo de proteínas y ácido nucleico, DNA o RNA. Un virus no está vivo pero puede invadir e infectar una célula viva y emplear la maquinaria sintética de la célula para la producción de más virus. Este proceso lleva consigo la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas virales y su posterior ensamblaje para formar los *viriones* o partículas virales maduras. Los estudios de este proceso han proporcionado gran cantidad de información sobre la estructura y el ensamblaje, que van más allá de lo que conocemos en otros sistemas autoensamblados.

Un ejemplo especialmente bueno es el virus del mosaico del tabaco (TMV), un virus vegetal que ha sido popular entre los biólogos moleculares desde hace mucho tiempo. El TMV tiene una forma particular de bastón con alrededor de 18 nm de diámetro y 300 nm de longitud. Consiste en una hebra única de RNA con unos 6.000 nucleótidos y cerca de 2.130 copias de un mismo tipo de polipéptido de 158 aminoácidos, la proteína de recubrimiento. La molécula de RNA forma un núcleo helicoidal rodeado por un cilindro de subunidades proteicas (Figura 2.20).

Heinz Fraenkel-Conrat y colaboradores realizaron diversos experimentos importantes que contribuyeron significativamente a la comprensión del autoensamblaje. Ellos separaron el TMV en sus componentes de RNA y proteína y permitieron que se reensamblasen in vitro (en tubos de ensayo). Las partículas virales regeneradas fueron capaces de infectar células vegetales. Este resultado fue una de las primeras demostraciones y más convincentes de que los componentes en una estructura biológica compleja se pueden reagrupar espontáneamente en entidades funcionales sin información externa. Resulta especialmente interesante el descubrimiento de que el RNA de una cepa de virus se pudiese mezclar con el contenido proteico de otra cepa para formar un virus híbrido con capacidad infecciosa. Como era esperable, el origen del RNA y no el de las proteínas determinan el tipo de virus que se producen en las células infectadas.

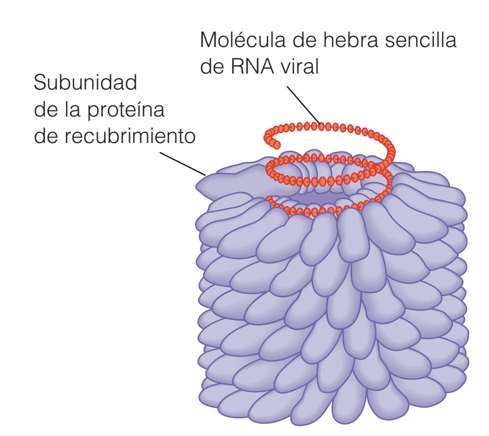


Figura 2.20 Un modelo estructural del virus del mosaico del tabaco (TMV). Una molécula de hebra simple de RNA se enrolla para formar una hélice, rodeada por un recubrimiento que consiste en 2.130 subunidades proteicas idénticas. Únicamente se representa una porción del virión TMV completo, y se han omitido numerosas capas de proteínas del extremo superior de la estructura para mostrar la molécula helicoidal de RNA en el interior.

El proceso de ensamblaje se ha estudiado detalladamente desde entonces y resulta ser sorprendentemente complejo. La unidad básica de ensamblaje es un disco de dos capas de proteínas, cada una de las cuales consiste en 17 subunidades idénticas ordenadas como un anillo (Figura 2.21a). Cada disco inicialmente es una estructura cilíndrica pero sufre un cambio conformacional que lo transforma en una hélice al interaccionar con un segmento corto (unos 102 nucleótidos) de la molécula de RNA (Figura 2.21b). Esta transición permite la unión del otro disco (Figura 2.21c) y cada disco sucesivamente sufre un cambio conformacional que lo transforma en una hélice que se une a otras 102 bases de RNA. El proceso de elongación disco a disco continúa y los discos sucesivos almacenados crean un camino helicoidal para la hebra de RNA (Figura 2.21d). Finalmente el proceso da lugar a un virión maduro cuyo RNA está completamente cubierto por la proteína de recubrimiento.

El autoensamblaje tiene límites

En muchos casos, la información necesaria para especificar la configuración exacta de la estructura celular parece residir enteramente en los polímeros que contribuyen a esta estructura. Este sistema de autoensamblaje alcanza configuraciones tridimensionales estables sin información adicional porque el contenido de información de los polímeros es adecuado para especificar el proceso completo de ensamblaje. Incluso en el autoensamblaje asistido, las chaperonas no confieren información adicional.

Sin embargo, algunos sistemas de ensamblaje parecen depender, además de la información facilitada, por una estructura preexistente. En estos casos, la estructura última se origina no por el ensamblaje de componentes en una nueva estructura sino por el ordenamiento de componentes en la matriz de una estructura existente. Ejemplos de estructuras celulares que son construidas rutinariamente añadiendo material nuevo a las estructuras existentes incluyen membranas, paredes celulares y cromosomas.

Por otro lado, estas estructuras no están todavía suficientemente caracterizadas para determinar si la presencia de una estructura preexistente es obligatoria o si por el contrario en condiciones favorables los componentes pueden ser capaces de autoensamblarse. Las evidencias obtenidas en estudios con membranas artificiales y con cromatina (componentes cromosómicos aislados) sugieren por ejemplo que la estructura preexistente, aunque está pre-

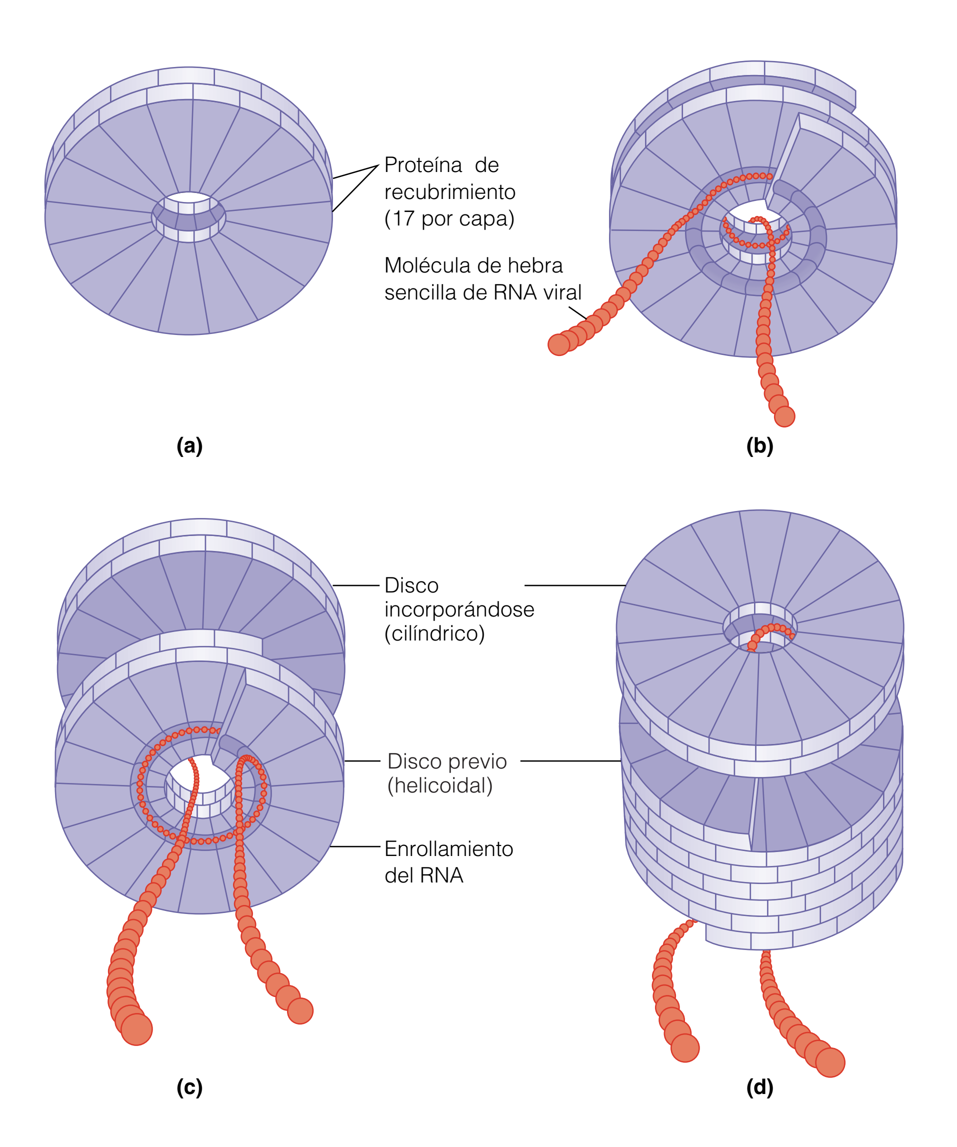


Figura 2.21 Autoensamblaje de un virión del virus del mosaico del tabaco (TMV). (**a**) La unidad de ensamblaje es un disco de doble capa con 17 proteínas por capa. (**b**) El ensamblaje comienza cuando la molécula de RNA viral se asocia con un disco causando la formación de un bucle en la molécula de RNA (implica 102 nucleótidos) y el cambio del disco de una conformación cilíndrica a otra helicoidal. (**c**) Se añade otro disco, y otra porción de RNA se asocia con él. Mientras tanto el disco ha cambiado de una conformación cilíndrica a otra helicoidal. (**d**) Cada disco que se incorpora proporciona dos capas más adicionales de subunidades proteicas y produce que otros segmentos de RNA se asocie con la estructura en un bucle espiral, el proceso continúa hasta que la molécula de RNA es recubierta y el virión es completo.

sente in vivo de forma rutinaria, puede no ser un requerimiento indispensable para el proceso de ensamblaje. Resulta necesario profundizar más antes de poder decir con seguridad si es o no necesario, y hasta qué punto la información externa es requerida o explotada en los procesos de ensamblaje celular.

El ensamblaje jerárquico proporciona ventajas a la célula

Cada uno de los procesos de ensamblaje que hemos examinado ejemplifica la estrategia básica celular del **ensamblaje jerárquico** ilustrado en la Figura 2.14. Las estructuras biológicas están casi siempre construidas de una manera jerárquica, con intermediarios importantes en el camino desde las moléculas simples iniciales a los productos finales de orgánulos, células y organismos. Considere cómo están hechas las estructuras celulares. En primer lugar, un gran número de subunidades monoméricas similares, o incluso idénticas, se unen por condensación para formar polímeros. Estos polímeros se agregan de manera espontánea pero específicamente para formar unidades multiméricas características. Las unidades multiméricas pueden a su vez dar lugar a estructuras aún más complejas y eventualmente a agregados que son reconocidos como estructuras subcelulares distintivas.

Este proceso jerárquico tiene la doble ventaja de la simplicidad química y la eficiencia de ensamblaje. Para apreciar la simplicidad química, necesitamos reconocer que casi todas las estructuras presentes en las células y organismos se sintetizan a partir de 30 pequeñas moléculas precursoras que George Wald ha llamado del «alfabeto de la bioquímica». Este «alfabeto» incluye los 20 aminoácidos que se encuentran en las proteínas, las cinco bases aromáticas presentes en los ácidos nucleicos, dos azúcares y tres moléculas de lípidos. Encontraremos cada uno de ellos en el Capítulo 3 (*véase* Tabla 3.2). Con esos ladrillos y los polímeros que pueden derivar de ellos a través de algunas reacciones de condensación diferentes, se puede elaborar la mayor parte de la complejidad estructural de la vida mediante ensamblaje jerárquico en estructuras sucesivamente más complejas.

Tempus Fugit y el arte de hacer relojes

«Caray, ¡otro reloj defectuoso!» Con una mirada de disgusto, el relojero Tempus Fugit sacudió el reloj defectuoso en la papelera y gruñó para sí mismo, «este es el segundo de tres relojes que he tenido que tirar. ¿Qué clase de relojero soy?».

«Una buena pregunta Fugit» sonó una voz desde la entrada. Tempus levantó la mirada para ver cómo Caveat Emptor entraba en la tienda. «Quizá yo pueda ayudarte si me cuentas como haces tus relojes.»

«Nadie te ha pedido ayuda, Emptor» gruñó Tempus irritadamente, deseando fervientemente que no le hubiesen sorprendido pensando en alto.

«Ah, bien, lo tendrás igualmente» continuó Caveat imperturbado. «Ahora dime exactamente cómo haces un reloj y cuánto tiempo te lleva. Estaría especialmente interesado en comparar tus procedimientos con la forma de hacerlos de Pluribus Unum en su nueva tienda de esta calle.»

Al oír el nombre de su competidor, Tempus gimió otra vez. «¡Unum!» protestó ¿Y qué sabe él del arte de hacer relojes?

«Aparentemente mucho —probablemente más que tú» contestó Caveat. «Pero dime exáctamente. ¿Cuántos pasos te lleva cada reloj y con qué frecuencia cometes errores?»

«Hacer un reloj me lleva exactamente 100 operaciones. Cada paso tiene que estar bien realizado o el reloj no funcionará. Es un negocio delicado, pero yo he reducido mi tasa de error a un 1%», dijo Tempus, con un rasgo de orgullo en su voz. «Puedo hacer un reloj, desde el principio hasta el final, exactamente en una hora, pero sólo hago 36 relojes cada semana, ya que siempre dejo de trabajar los martes por la tarde para jugar a los dardos.»

«Bueno, ahora veamos», dijo Caveat, mientras sacaba una calculadora de bolsillo. «Eso significa, mi buen Mr. Fugit, que usted sólo hace 13 relojes por semana que realmente funcionen. Todos los demás los tiene que tirar como el que estaba haciendo cuando yo entré en su tienda.»

«¿Y cómo sabe eso?» Preguntó Tempus a la defensiva, preguntándose cómo, con su calculadora, podría haber adivinado su secreto cuidadosamente guardado.

«Elemental querido Watson», contestó Caveat con regocijo.

«Simple probabilidad. Me has dicho que cada reloj requiere 100 operaciones y que hay un 99% de probabilidad de realizar cada paso correctamente. Eso supone 0,99 de cada veces 100 veces, lo que supone 0,366. Por lo tanto únicamente se ensamblan correctamente un 37% de sus relojes, y además no puedes predecir nada acerca de un determinado reloj hasta que está terminado y lo pruebas. ¿Quieres saber cómo se compara esto con la tienda de Unum?»

Tempus iba a protestar, pero su atormentador se precipitó. «Él también consigue 100 operaciones por hora, y su tasa de error es exactamente la misma que la tuya. También deja de trabajar los martes por la tarde, sin embargo él consigue hacer 27 relojes cada semana. Eso es el doble que tu producción, ¡Fugit! Por lo tanto, no es sorprendente que él tenga tantos relojes en su escaparate y tantos clientes en su puerta. He oído que incluso está pensando en ampliar la tienda. ¿Quieres saber cómo lo hace?»

Tempus estaba demasiado deprimido incluso para intentar protestar. Y aunque no le gustaría admitirlo, se estaba muriendo por saber cómo lo hacía Unum.

«¡Ensamblaje de subunidades, Fugit, esa es la respuesta! ¡Ensamblaje de subunidades! En lugar de hacer relojes desde el principio en 100 pasos separados, Unum ensambla los componentes en 10 piezas, cada una de las cuales requiere 10 pasos.» Caveat comenzó a pulsar botones de la calculadora otra vez. «Veamos, él realiza 10 operaciones con una tasa de éxito del 99%, por lo tanto él eleva 0,99 a la décima potencia en lugar de a la centésima. Eso hace 0,904, lo que significa que alrededor del 90% de sus subunidades no tienen errores. Es decir, él emplea alrededor de 33 horas cada semana para hacer 330 subunidades, tira las que tienen defectos, y todavía tiene alrededor de 300 para ensamblar 30 relojes en las últimas tres horas de los viernes por la tarde. Eso supone 10 pasos por reloj, con la misma tasa de error de antes, por lo que otra vez tiene un 90% de éxito. Tiene que tirar alrededor de tres relojes terminados, por lo que acaba con 27 relojes. Mientras tanto, tú has estado trabajando tanto y con tanta precisión como él y sin embargo sólo produces la mitad de relojes. ¿Qué tienes que decir a eso mi querido Fugit?»

Tempus respondió cansadamente. «Sólo una pregunta, Emptor, y probablemente me odiaré a mí mismo por preguntar. ¿Sabes lo que hace Unum los martes por la tarde?»

«Me alegro de que me lo preguntes», respondió Caveat mientras se metía la calculadora de bolsillo y se dirigía a la puerta. «Pero no creo consiga que se interese por los dardos —él emplea cada martes por la tarde dando lecciones de cómo hacer relojes.»

La segunda ventaja del ensamblaje jerárquico radica en el «control de calidad» que se puede ejercer en cada nivel del ensamblaje, posibilitando la eliminación de los compuestos defectuosos en un estadio temprano, más que cuando ya se han transformado en estructuras complejas que serían más costosas de eliminar y reemplazar. Así, si la unidad defectuosa se ha insertado en un polímero en un punto crítico de la cadena, esa molécula particular deberá ser desechada, pero se evitará el coste para la célula de sintetizar un agregado supramolecular más complicado o incluso todo un órgano antes de que el defecto sea descubierto. La historia mostrada en el Anexo 2A pretende ilustrar este principio básico.

Perspectiva

En resumen, los ladrillos moleculares básicos de la célula son pequeñas moléculas orgánicas que pueden ser unidas mediante polimerización para formar macromoléculas que son tan importantes para la estructura y la función celular. Aproximadamente 30 clases de unidades monoméricas diferentes forman la mayor parte de la estructura celular. Estas unidades monoméricas están formadas principalmente por carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y fósforo, todos ellos disponibles en el mundo vivo en forma de compuestos inorgánicos como el dióxido de carbono, agua, amonio, nitrato y fosfato. La mayoría de estas pequeñas moléculas orgánicas son bastante solubles en agua debido a la presencia de grupos funcionales polares. La célula es capaz de retener esas moléculas en espacios definidos al tener membranas selectivamente permeables, con una zona interna hidrofóbica que no pueden penetrar la mayoría de moléculas polares a no ser que existan proteínas transportadoras específicas en las membranas.

La polimerización para formar macromoléculas requiere que las moléculas monoméricas sean activadas apropiadamente, normalmente a expensas del ATP. Los polímeros resultantes se pueden doblar y enrollar espontáneamente e interaccionan entre sí de manera predecible para generar con éxito estructuras de orden más alto. La información necesaria para ese proceso de ensamblaje es inherente a la naturaleza química de las unidades monoméricas y al orden en que los monómeros, diferentes químicamente, se unen. En algunos (incluso en muchos) casos, proteínas denominadas chaperonas parecen mediar en el ensamblaje, previniendo la formación de estructuras incorrectas más que facilitando información estérica adicional. Esa estrategia de ensamblaje jerárquico de subunidades tiene la doble ventaja de la simplicidad química y la eficiencia en el ensamblaje.

Con estos principios en mente, estamos preparados pasar al Capítulo 3 en el que examinaremos las principales clases de macromoléculas biológicas y la naturaleza química de las subunidades a partir de las cuales se sintetizan.

Problemas

Los problemas de mayor dificultad están marcados con un •.

2.1 Estado del carbono. Cada una de las siguientes propiedades es una característica del átomo de carbono. Indique en cada caso cómo contribuyen dichas propiedades a las funciones que el átomo de carbono desempeña como átomo más importante de las moléculas biológicas.

(a) El átomo de carbono tiene una valencia de cuatro.

(b) Los enlaces carbono-carbono tienen una energía de enlace bastante mas alta que la de los fotones de la luz en rango visible (400-700 nm).

(c) Un átomo de carbono se puede unir simultáneamente a otros dos átomos de carbono.

(d) Los átomos de carbono se pueden unir a átomos de hidrógeno, nitrógeno y azufre.

(e) Los compuestos que contienen carbono pueden contener átomos de carbono asimétricos.

2.2 Estado del agua. Decida cuál de las siguientes afirmaciones sobre el agua es cierta y describa una propiedad que hace del agua un componente deseable para las células (V); describa una propiedad que no aporta nada a las células (X). Indique, para cada afirmación verdadera, un posible beneficio para los organismos vivos.

(a) El agua es una molécula polar y por tanto un solvente excelente para los compuestos polares.

(b) El agua se puede formar por la reducción del oxígeno molecular (O_2).

(c) La densidad del agua es menor que la del hielo.

(d) Las moléculas de agua en estado líquido están unidas abundantemente entre sí mediante puentes de hidrógeno.

(e) El agua no absorbe la luz visible.

(f) El agua es inodora e insípida.

(g) El agua tiene un calor específico elevado.

(h) El agua tiene un calor de vaporización elevado.

2.3 Verdadero o falso. Identifique como verdadero (V) o falso (F) cada una de las siguientes afirmaciones. Modifique cada afirmación falsa para transformarla en una verdadera.

(a) El oxígeno, nitrógeno y carbono son los elementos que más fácilmente forman enlaces múltiples fuertes.

(b) El agua tiene un calor de vaporización más alto que la mayoría de líquidos debido a su elevado calor específico.

(c) Las gotas de aceite se unen en el agua para formar una fase separada debido a la fuerte atracción que tienen las moléculas hidrofóbicas entre ellas.

(d) En un puente de hidrógeno, se comparten electrones entre un átomo de hidrógeno y dos átomos electronegativos adyacentes.

(e) La formación de puentes internos disulfuro es la principal fuerza que dirige el tratamiento de proteínas.

2.4 Energías de enlace. La relación entre la cantidad de energía que se requiere para romper los enlaces y la cantidad de energía disponible en la radiación solar a la que se exponen dichos enlaces tiene una importancia considerable para determinar el estado de los enlaces en las moléculas orgánicas.

(a) Dado que el enlace simple de carbono-carbono no se modifica por la luz verde (500 nm) pero se puede romper por la energía de la luz ultravioleta (por ejemplo, 300 nm), ¿de qué longitud de onda es la luz que tiene exactamente la energía necesaria para romper un enlace simple carbono-carbono?

(b) ¿Un enlace carbono-nitrógeno expuesto a la luz de esta longitud de onda sería más o menos estable que un enlace carbono-carbono?

(c) ¿Y respecto a un doble enlace carbono-carbono?

2.5 Estereoisómeros. Indique cuántos estereoisómeros existen para cada uno de los siguientes compuestos y dibuje la estructura de cada una de ellos:

```
          O
          ||
          C — O⁻
          |
H3N⁺ — C — H
          |
   H — C — CH3
          |
          CH2
          |
          CH3
```

(a) Isoleucina (aminoácido)

```
      O
      ||
      C — O⁻
      |
      C = O
      |
  H — C — H
      |
      C — O⁻
      ||
      O
```

(b) Oxalacetato (forma ionizada de un ácido carboxílico)

```
      H
      |
      C = O
      |
  H — C — OH
      |
  H — C — OH
      |
  H — C — OH
      |
      CH2OH
```

(c) Ribosa (pentosa presente en el DNA)

```
      H
      |
      C = O
      |
  H — C — H
      |
  H — C — OH
      |
  H — C — OH
      |
      CH2OH
```

(d) Deoxiribosa (pentosa presente en el DNA)

2.6 Acerca de las membranas. Conteste a cada una de las siguientes preguntas acerca de las membranas biológicas en menos de 50 palabras.

(a) ¿Qué es una molécula anfipática? ¿Por qué las moléculas anfipáticas son constituyentes importantes de las membranas?

(b) ¿Por qué las membranas están formadas por bicapas lipídicas en lugar de por monocapas?

(c) ¿Qué significa la afirmación de que las membranas son selectivamente permeables?

(d) Si una bicapa lipídica es 10^8 veces menos permeable a los iones de K^+ que al agua ¿Cómo entran en las células los iones K^+ que son necesarios para multitud de funciones?

(e) La determinación del número de secuencias cortas de aminoácidos hidrofóbicos presentes en la secuencia de una proteína de membrana es a menudo útil para predecir el número de veces más que una proteína de membrana cruza la membrana. Explíquelo.

(f) ¿Porqué las cadenas laterales de carbohidratos de la proteína mostrada en la Figura 2.13b están unidas a regiones hidrofílicas en lugar que a regiones hidrofóbicas?

2.7 La polaridad del agua. Defienda la afirmación de que en la vida, tal y como la conocemos, depende críticamente del hecho de que el ángulo entre los dos átomos de hidrógeno de la molécula de agua es de 104,5° y no de 180°.

2.8 El principio de los polímeros. Los polímeros juegan claramente un papel importante en la economía molecular de la célula. ¿Qué ventajas tienen para las células las siguientes características de los polímeros biológicos?

(a) Un tipo particular de polímero está formado por la utilización del mismo tipo de reacción de condensación para añadir unidades monoméricas sucesivas.

(b) Los enlaces entre los monómeros se forman mediante la eliminación de agua y se rompen mediante la adición de agua.

•2.9 Ensamblaje del TMV. Cada una de las siguientes afirmaciones consiste en una observación experimental relacionada con el reensamblaje de viriones del virus el mosaico del tabaco (TMV) a partir de TMV RNA y subunidades de la proteína de recubrimiento. Afirme, en cada caso, una conclusión razonable que se pueda extraer de la observación experimental.

(a) Cuando el RNA de una cepa específica de TMV se mezcla con una proteína de recubrimiento procedente de la misma cepa se forman viriones infecciosos.

(b) Cuando el RNA de la cepa A de TMV se mezcla con una proteína de recubrimiento de la cepa B, los viriones que se forman son infecciosos, dando lugar a partículas virales de la cepa A en las células del tabaco infectadas.

(c) Los monómeros aislados de la proteína de recubrimiento pueden polimerizar para formar una estructura helicoidal viral en ausencia de RNA.

(d) Los viriones TMV que se forman en células vegetales infectadas contienen únicamente TMV RNA y nunca ninguno de los otros tipos celulares de RNAs presentes en la célula huésped.

(e) Independientemente de la proporción entre RNA y proteína de recubrimiento de la mezcla inicial, los viriones que se reensamblan contienen siempre RNA y proteína de recubrimiento en una proporción de tres nucleótidos de RNA por cada monómero de proteína de recubrimiento.

•2.10 Esta es la respuesta. ¿Cuál es la pregunta? Cada una de las siguientes afirmaciones es una *respuesta*; indique en cada caso cuál es la pregunta.

(a) Este componente de la radiación solar es suficientemente energético para romper los enlaces carbono-carbono.

(b) Esta propiedad del agua hace posible el enfriamiento de los animales terrestres mediante la evaporación superficial con una mínima pérdida de fluidos corporales.

(c) La siguiente unidad monomérica que se une a un polímero debe estar en este estado para que la reacción de condensación sea favorable energéticamente.

(d) Este principio de la biosíntesis de macromoléculas minimiza la cantidad de energía genética necesaria y hace posible desechar los componentes imperfectos en distintos estadios.

(e) Esta propiedad de una molécula hace probable que se encuentre en una membrana.

Bibliografía recomendada

Las referencias con importancia histórica están marcadas con •.

Referencias generales y revisiones

Bhagavan, N. Y. *Medical Biochemistry*. San Diego: Harcourt/Academic Press, 2002.

Lehninger, A. L., D. L. Nelson y M. M. Cox. *Principles of Biochemistry*, 3rd ed. New York: Worth, 1999.

Malacinski, G. M. *Essentials of Molecular Biology*, 4th ed. Boston: Jones and Barletts, 2003.

Mathews, C. K., K. E. van Holde y K. G. Ahern. *Biochemistry*, 3rd ed. Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings, 2000.

Thornton, R. M.. *The Chemistry of Life*. Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings, 1998. (A CD-ROM that uses interactive exercises to help bridge the gap between chemistry and biology.)

Wald, G. The origins of life. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 52 (1994): 595.

La importancia del agua

Bryant, R. G. The dynamics of water-protein interactions. *Annu. Rev. Biophys. Biolmolec. Struct.* 25 (1996): 29.

Mathews, R. Wacky water. *New Scientist* (June 21, 1997).

Westof, E. ed. *Water and Biological Macromolecules*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1993.

Wiggins, P. M. Role of water in some biological processes. *Microbiol. Rev.* 54 (1990): 432.

La importancia de las membranas

Baldwin, S. A. *Membrane Transport: A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press, 2000.

Mellman, I., and G. Warren. The road taken: Past and future foundations of membrane traffic. *Cell* 100 (2000): 99.

Petty, H. R. *Molecular Biology of Membranes: Structure and Function*. New York: Springer Verlag, 1993.

Rees, D. C. *Membrane Proteins*. Boston: Academic Press, 2003.

Tien, H. T., and A. Ottova-Leitmannova. *Membrane Biophysics: As Viewed from Experimental Bilayer Lipid Membranes*. New York: Elsevier, 2000.

La importancia de las macromoléculas

Creighton, T. E. *Proteins: Structure and Molecular Properties*, 2nd ed. New York: W. H. Freeman, 1993.

Gesteland, R. F. y J. F. Atkins, eds. *The RNA World*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.

Ingber, D. E. The architecture of life. *Sci. Amer*. 278 (January 1998): 48.

Jardetzky, O. y M. D. Finucane. *Dynamics, Structure, and Function of Biological Macromolecules*. Washington, DC: IOS Press, 2001.

Petsko, G. A. y D. Ringe. *Protein Structure and Function*. Sunderland, MA: Sinauer Assoc., 2004.

Schulz, G. E. y R. H. Schirmer. *Principles of Protein Structure*. New York: Springer Verlag, 1990.

•Watson, J. D. y J. Tooze. *The DNA Story*. San Francisco: Freeman, 1981.

Yon, J. M. Protein folding: Concepts and perspectives. *Cell. Mol. Life Sci.* 53 (1997): 557.

La importancia del autoensamblaje

•Anfinsen, C. B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181 (1973): 223.

Baker, D. A surprising simplicity to protein folding. *Nature* 405 (2000): 39.

Borman, S. Untangling complex proteins. *Chem. Engr. News* 77 (1999): 36.

Bruinsma, R. F., W. M. Gelbart, D. Reguera, J. Rodnick y R. Zandi. Viral self-assembly as a thermodynamic process. *Phys. Rev. Lett.* 90 (2003): 248.

Buchner, J. Supervising the fold: Functional principles of molecular chaperones. *FASEB J.* 10 (1996): 10.

Creighton, T. E. Protein folding: An unfolding story. *Curr. Biol.* 5 (1995): 353.

•Ellis, R. J. Discovery of molecular chaperones. *Cell Stress and Chaperones* 1 (1996): 155.

Ellis, R. J., ed. *The Chaperonins*. New York: Academic Press, 1996.

•Ellis, R. J. y S. M. Van der Vies. Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 60(1991): 321.

Flannery, M. C. Proteins: The unfolding and folding picture. *Amer. Biol. Teacher* 61 (1999): 150.

•Fraenkel-Conrat, H., and R. C. Williams. Reconstitution of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 41 (1955): 690.

Ringler, P. y G. E. Schulz. Self-assembly of proteins into designed networks. *Science* 302 (2003): 106.

Strauss, E. How proteins take shape. *Science News* (6 de septiembre, 1997).

3

Las macromoléculas de la célula

En el Capítulo 2 se consideraron algunos de los principios básicos de la organización química de la célula. Vimos que las macromoléculas biológicas —proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos— están formados por la repetición de un número relativamente pequeño de monómeros (de 1 a 20). Estos polímeros se sintetizan en reacciones de condensación, en las que los monómeros activados se unen entre sí, con liberación de agua. Una vez sintetizados, los polímeros se pliegan de forma espontánea, dando lugar a estructuras tridimensionales estables. Las moléculas plegadas se asocian luego de forma jerárquica, en estructuras de mayor nivel de complejidad, generalmente sin necesidad de aporte energético o instrucciones nuevas.

Estamos pues en disposición de estudiar los principales tipos de macromoléculas biológicas. En cada uno de los casos, nos centraremos primero en la naturaleza química de los monómeros, y luego analizaremos la síntesis y las propiedades de los polímeros. Como veremos en breve, la mayoría de las macromoléculas se sintetizan a partir de sólo unas 30 moléculas pequeñas. Empezaremos por las proteínas, ya que desempeñan muchos y muy importantes papeles, tanto en la estructura, como en las funciones celulares. Posteriormente analizaremos los ácidos nucleicos y los polisacáridos, para concluir con los lípidos que, si bien no son polímeros en el sentido estricto, sí que son constituyentes esenciales de la célula.

Proteínas

Las **proteínas** son, sin duda, las macromoléculas más abundantes y de distribución más amplia en la célula. De hecho, su nombre lleva implícita su importancia, pues en griego, la palabra *proteios* significa «preeminente». Ya estemos hablando de la fijación del dióxido de carbono durante la fotosíntesis, del transporte de oxígeno en la sangre, o de la motilidad del flagelo bacteriano, el proceso depende básicamente de determinadas proteínas con propiedades y funciones específicas.

Atendiendo a su función, las proteínas pueden clasificarse en nueve categorías (Tabla 3.1). Muchas proteínas son *enzimas*, que sirven como catalizadores que incrementan la tasa de miles de reacciones químicas, de las que depende la vida. Las *proteínas estructurales*, por otra parte, confieren forma a células y orgánulos, dándoles su apariencia característica. Las *proteínas motoras* intervienen en la contracción y en los movimientos de células y estructuras intracelulares. Las *proteínas reguladoras* son responsables del control y organización de las funciones celulares, permitiendo que las actividades estén en consonancia con las necesidades celulares. Las *proteínas transportadoras* están implicadas en la entrada y salida de sustancias, tanto en la célula, como en sus orgánulos. Las *hormonas proteicas* median en la comunicación entre células que están alejadas dentro de un organismo y los *receptores proteicos* facultan a la célula para responder a los estímulos químicos del medio. Finalmente, las *proteínas de defensa* proveen de protección frente a enfermedades y las *proteínas de almacenaje* sirven como reserva de aminoácidos. La mayoría de las proteínas tienen una única función, ya sea catalítica, estructural, motora o reguladora. Sin embargo, algunas son bifuncionales, es decir, que pueden ejercer dos funciones diferentes.

Teniendo en cuenta que, virtualmente, todo lo que es o hace una célula depende de las proteínas que tenga, es evidente que necesitamos comprender qué proteínas son y

Tabla 3.1 **Funciones de las proteínas**

Tipo de proteína	Función	Ejemplos
Enzimas	Catálisis selectiva	Enzimas digestivas que catalizan la hidrólisis de las macromoléculas de los alimentos.
Proteínas estructurales	Soporte de estructuras celulares	Las fibras de colágeno y elásticas forman la red de soporte de los tejidos conjuntivos; la queratina es la proteína de los pelos, astas, plumas y otras faneras tegumentarias.
Proteínas motoras	Movimiento de células y de componentes celulares	La actina y la miosina son responsables de la contracción muscular; la tubulina es el principal constituyente de cilios y flagelos.
Proteínas reguladoras	Regulación de las funciones celulares	Los factores de transcripción, proteínas que se unen al DNA, controlan la lectura de la información genética.
Proteínas de transporte	Entrada y salida de sustancias en la célula y en sus orgánulos	El transporte de glucosa y de otras moléculas pequeñas a través de las membranas, está mediado por proteínas transportadoras que residen en dichas membranas.
Hormonas proteicas	Comunicación entre partes distantes de un organismo	La insulina segregada por el páncreas de vertebrados regula la concentración de glucosa en la sangre.
Receptores proteicos	Permiten la respuesta celular frente a un estímulo químico	Los receptores de la membrana de las neuronas detectan las señales químicas emitidas por otras neuronas.
Proteínas de defensa	Confieren protección frente a enfermedades	Los anticuerpos del sistema circulatorio de vertebrados reconocen y destruyen a las bacterias y a los virus.
Proteínas de almacenaje	Almacenamiento y liberación de aminoácidos	Las proteínas almacenadas en las semillas, se hidrolizan durante la germinación, cediendo los aminoácidos necesarios.

Fuente: tomado de Campell and Reece, *Biology* 6th edition (San Francisco: Benjamin/Cummings, 2002), p. 72.

por qué tienen las propiedades que tienen. Comenzaremos nuestra discusión fijándonos en los aminoácidos proteicos, considerando más adelante algunas de las propiedades de las proteínas.

Los aminoácidos son los monómeros de las proteínas

Las proteínas son polímeros lineales de **aminoácidos**. Por término medio hay más de 60 aminoácidos distintos en las células, pero sólo 20 de ellos son incorporados en las proteínas, como se indica en la Tabla 3.2. (Algunas proteínas contienen más de los 20 aminoácidos referidos, pero en general es debido a modificaciones químicas que tienen lugar después de la síntesis de la proteína.) Aunque la mayoría de las proteínas contienen todos o casi todos los aminoácidos proteicos, las proporciones son variables.

Cada aminoácido tiene la estructura básica que se representa en la Figura 3.1, con un grupo carboxilo, un grupo amino, un átomo de hidrógeno y un grupo denominado R, todos ellos unidos a un átomo de carbono. Excepto la glicina, en la que el grupo R es un átomo de hidrógeno, todos los aminoácidos tienen un átomo de carbono asimétrico y, por tanto, existen en dos formas isoméricas, designadas como aminoácidos D y L. Ambos estereoisómeros están presentes en la naturaleza, pero en las proteínas sólo aparecen las formas L.

Dado que los grupos amino y carboxilo, dispuestos como se muestra en la Figura 3.1, son comunes a todos los aminoácidos, las propiedades específicas de cada uno de ellos depende, obviamente, de la naturaleza química de los

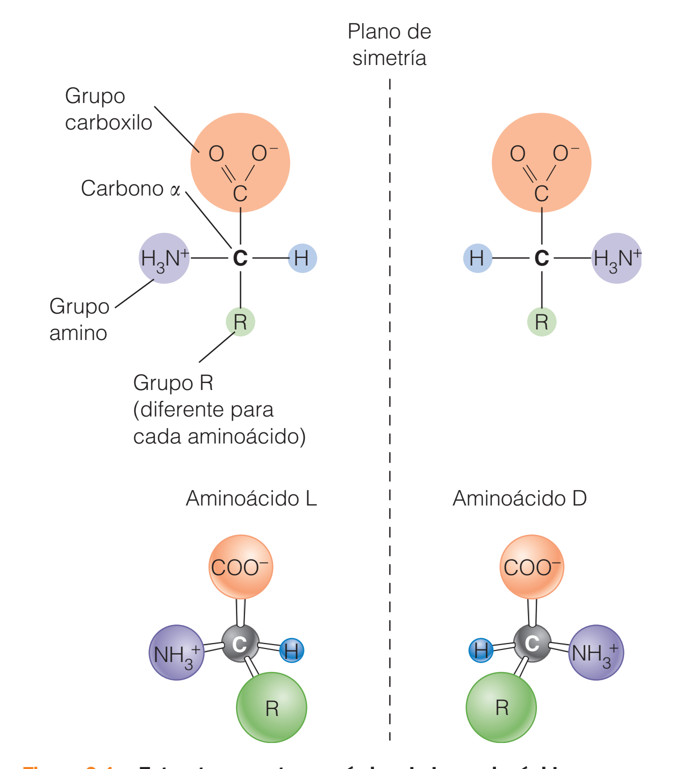


Figura 3.1 **Estructura y estereoquímica de los aminoácidos.** El átomo de carbono α es asimétrico en todos los aminoácidos, excepto en la glicina, por lo que éstos existen en dos formas isómeras, designadas D y L, y representadas según la fórmula estructural convencional (arriba) y según el modelo de varillas y esferas (abajo). Las formas L y D son estereoisómeras con relación al plano de simetría definido por la línea de puntos. Solamente los aminoácidos L están presentes en las proteínas.

Tabla 3.2 Las veinte moléculas más comunes en la célula

Tipo de molécula	Número	Nombre de las moléculas		Función en la célula	Estructura mostrada en la figura
Aminoácido	20	Alanina	Leucina	Unidades monoméricas	3.2
		Arginina	Lisina	de todas las proteínas	
		Asparagina	Metionina		
		Aspartato	Fenilalanina		
		Cisteína	Prolina		
		Glutamato	Serina		
		Glutamina	Treonina		
		Glicina	Triptófano		
		Histidina	Tirosina		
		Isoleucina	Valina		
Base aromática (purinas y pirimidinas)	5	Adenina Citosina	Timina Uracilo	Componentes de los ácidos nucleicos	3.15
		Guanina		(DNA y RNA)	
Azúcar (monosacáridos)	2	Ribosa		Componente de los ácidos nucleicos	3.15
		Glucosa		Metabolismo energético; componente del almidón y el glucógeno	3.21
Lípido	3	Colina Glicerol		Componentes de los fosfolípidos	3.27b
		Palmitato			3.28a

Fuente: adaptado de Wald (1994).

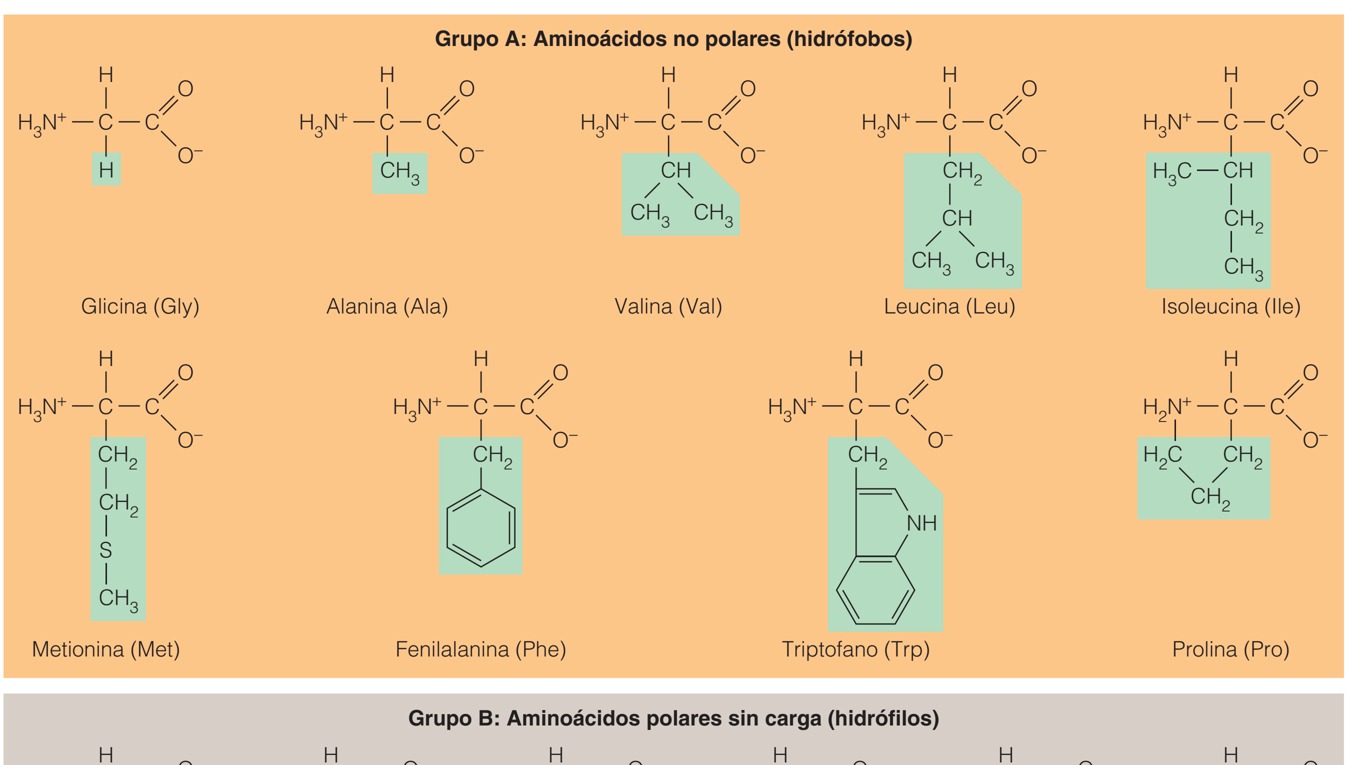
respectivos grupos R, que van desde un simple átomo de hidrógeno a los relativamente complejos grupos aromáticos. En la Figura 3.2 se muestra la estructura de los 20 aminoácidos L encontrados en las proteínas. La abreviatura de tres letras, entre paréntesis, se utiliza ampliamente por bioquímicos y biólogos moleculares. En la Tabla 3.3 se listan las abreviaturas de tres letras, junto con las correspondientes de una letra, que también son usadas a menudo.

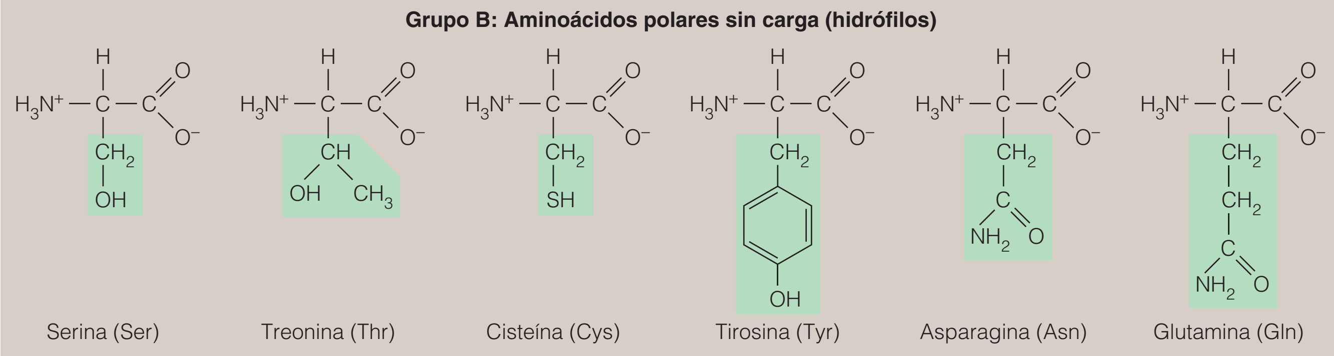
Nueve de estos aminoácidos tienen grupos R no polares y son, por tanto, *hidrófobos* (Grupo A). Viendo su estructura, se aprecia la naturaleza hidrocarbonada de los grupos R, carentes de nitrógeno y oxígeno. Estos aminoácidos tienden a situarse hacia el interior de la molécula, conforme el péptido se pliega en su conformación tridimensional. Si una proteína (o una región de la molécula) exhibe una preponderancia en aminoácidos hidrófobos, la proteína completa (o su porción hidrofóbica) quedará excluida de ambientes acuosos, localizándose en medios hidrófobos, como el interior de una membrana.

Los 11 aminoácidos restantes son hidrófilos, con grupos R que son claramente polares (Grupo B; obsérvese la presencia de oxígeno) o están cargados a los valores de pH característicos de las células (Grupo C; nótese, en cada caso, la carga neta positiva o negativa). Los aminoácidos hidrófilos tienden a aflorar hacia la superficie de las proteínas, maximizando así sus interacciones con las moléculas polares del agua del medio.

Tabla 3.3 Abreviaturas de aminoácidos

Aminoácido	Abreviatura de tres letras	Abreviatura de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Aspartato	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamato	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V





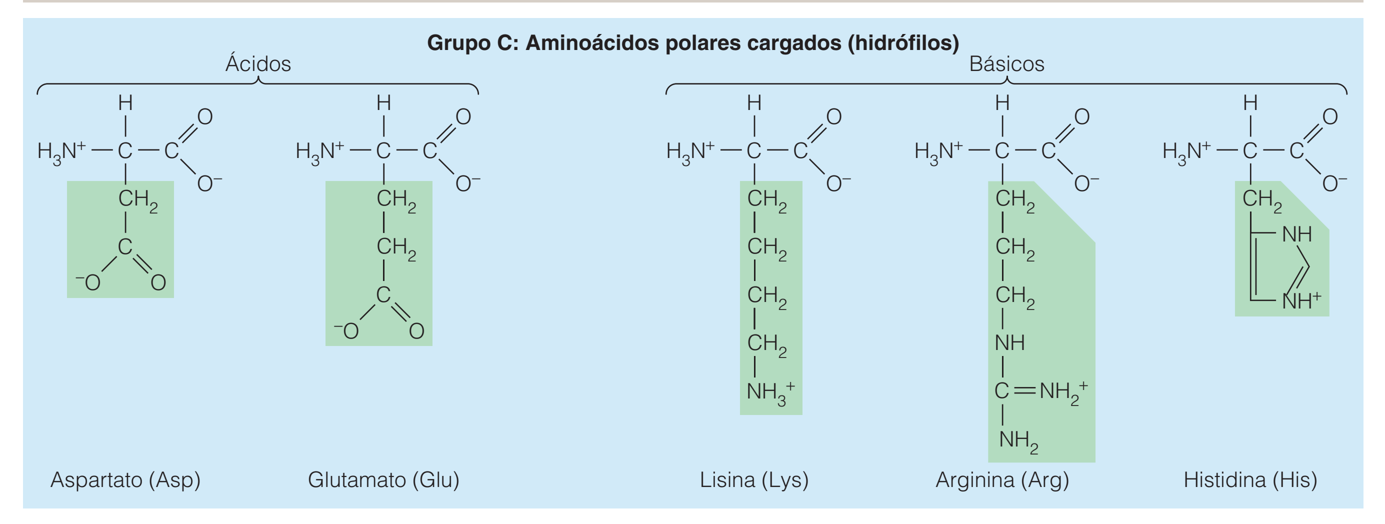


Figura 3.2 Estructura de los 20 aminoácidos proteicos. Todos los aminoácidos tienen un grupo carboxilo y un grupo amino adyacentes al carbono α, distinguiéndose por el grupo R (en verde). Los del Grupo A tienen radicales R no polares y son, por tanto, hidrófobos; apréciese la naturaleza hidrocarbonada del radical. El resto son hidrófilos, bien porque el radical R es de naturaleza polar (Grupo B), bien porque está protonado o ionizado al pH celular y, por tanto, cargado electrostáticamente (Grupo C). En esta figura se emplea la nomenclatura basada en tres letras; para las abreviaturas de una sola letra, *véase* la Tabla 3.3. Ambos tipos de abreviaturas se usan comúnmente.

Los polipéptidos y las proteínas son los polímeros

El proceso de encadenamiento de los aminoácidos para formar polímeros lineales, requiere la adición de cada nuevo aminoácido al polímero en formación, mediante una reacción de *deshidratación* (o *condensación*). Los grupos —H y —OH que se eliminan en forma de agua, provienen del grupo carboxilo de uno de los aminoácidos y del grupo amino del otro:

$$\underset{\text{Aminoácido 1}}{\mathrm{H{-}\overset{\overset{\displaystyle H}{|}}{N}{-}\overset{\overset{\displaystyle R_1}{|}}{CH}{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}{-}OH}} \;+\; \underset{\text{Aminoácido 2}}{\mathrm{H{-}\overset{\overset{\displaystyle H}{|}}{N}{-}\overset{\overset{\displaystyle R_2}{|}}{CH}{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}{-}OH}} \longrightarrow$$

$$\underset{\text{Péptido}}{\mathrm{H{-}\overset{\overset{\displaystyle H}{|}}{N}{-}\overset{\overset{\displaystyle R_1}{|}}{CH}{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}{-}\overset{\overset{\displaystyle H}{|}}{N}{-}\overset{\overset{\displaystyle R_2}{|}}{CH}{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}{-}OH}} \;+\; H_2O$$

El enlace covalente entre un grupo carboxilo y otro amino se denomina enlace amida, si bien en este caso, en el que los dos reactivos son aminoácidos, suele denominarse **enlace peptídico**. La formación del enlace peptídico se ilustra esquemáticamente en la Figura 3.3, en base a un modelo de esferas y varillas de los aminoácidos glicina y alanina. Obsérvese que la cadena de aminoácidos así formada tiene una direccionalidad intrínseca, pues termina con un grupo amino en un extremo y con un grupo carboxilo en el otro. El extremo con el grupo amino se denomina **N-** (o **amino**) **terminal** y el extremo con el grupo carboxilo, **C-** (o **carboxilo**) **terminal**.

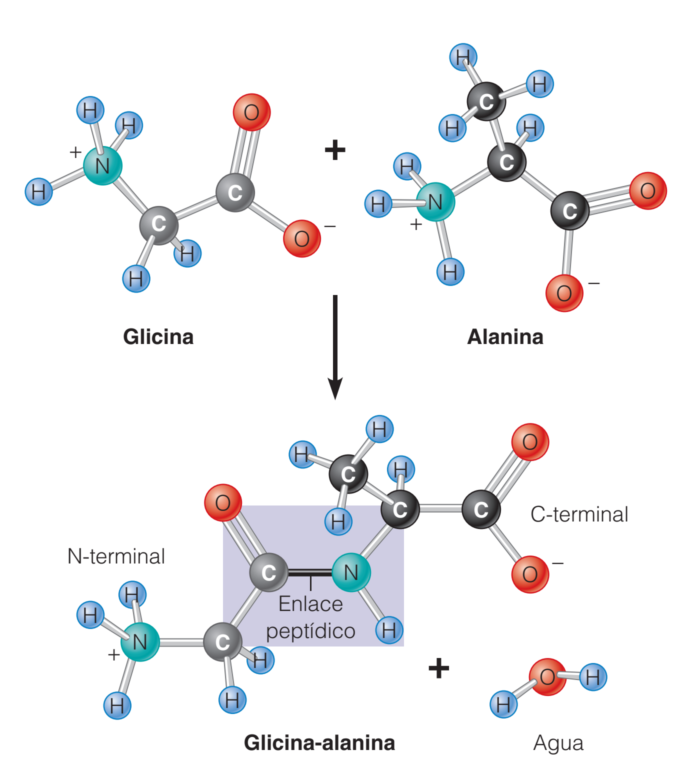


Figura 3.3 Formación del enlace peptídico. Los sucesivos aminoácidos de un polipéptido se unen entre sí por enlaces peptídicos, formados por el grupo carboxilo de un aminoácido y el amino del siguiente. Aquí se muestra la formación del enlace peptídico entre los aminoácidos glicina y alanina.

La formación del enlace peptídico es en realidad más compleja de lo que sugiere la Figura 3.3, pues para la adición de cada aminoácido, son necesarias, tanto energía, como información. Se precisa energía para activar al aminoácido entrante y unirlo a una molécula específica de RNA, denominada *RNA de transferencia*. La información es necesaria, pues el orden de los aminoácidos en la cadena polipeptídica naciente, no es aleatorio, sino que está definido genéticamente. La correcta elongación de la cadena depende de un proceso de reconocimiento entre el RNA transferente, al cual se une el aminoácido y el RNA mensajero, que está unido al ribosoma. En su momento, se analizará detalladamente el proceso; por ahora es suficiente considerar que, por cada nuevo enlace peptídico formado, el péptido crece en un aminoácido y este proceso requiere información y energía.

Aunque el proceso de elongación de la cadena aminoacílica es conocido como *síntesis de proteínas*, el término no es totalmente correcto, pues el producto inmediato de la polimerización de aminoácidos no es una proteína, sino un **polipéptido**. Una proteína es una o varias cadenas polipeptídicas, que adquieren una estructura tridimensional única, que le confiere su actividad. Algunas proteínas están formadas por un único polipéptido y, por tanto, su forma final depende de los plegamientos y enrollamientos que tienen lugar, de forma espontánea, mientras crece la cadena (*véase* Figura 2.18b). Tales proteínas se denominan **monoméricas**. (Préstese atención a la terminología: por un lado, un polipéptido es un *polímero*, cuyos monómeros son los aminoácidos; por otro, es un *monómero*, el conjunto de los cuales forma una proteína). La enzima ribonucleasa mostrada en la Figura 2.18, es un ejemplo de proteína monomérica. En tales proteínas, el término síntesis proteica es apropiado para designar la polimerización, puesto que la proteína funcional se forma espontáneamente, a medida que el polipéptido se elonga.

Otras muchas proteínas son **multiméricas**, es decir, están formadas por dos o más subunidades polipeptídicas. Se denominan *homoméricas* cuando sus subunidades son idénticas y *heteroméricas* cuando están formadas por dos o más subunidades diferentes. La hemoglobina, que porta el oxígeno en nuestro torrente sanguíneo, es una proteína multimérica formada por cuatro polipéptidos, dos *subunidades α-globina* o cadenas α y dos *β-globinas* o cadenas β (Figura 3.4). En estos casos, la síntesis de proteínas implica no sólo la elongación y el plegamiento de cada polipéptido, sino también su subsiguiente interacción y ensamblaje.

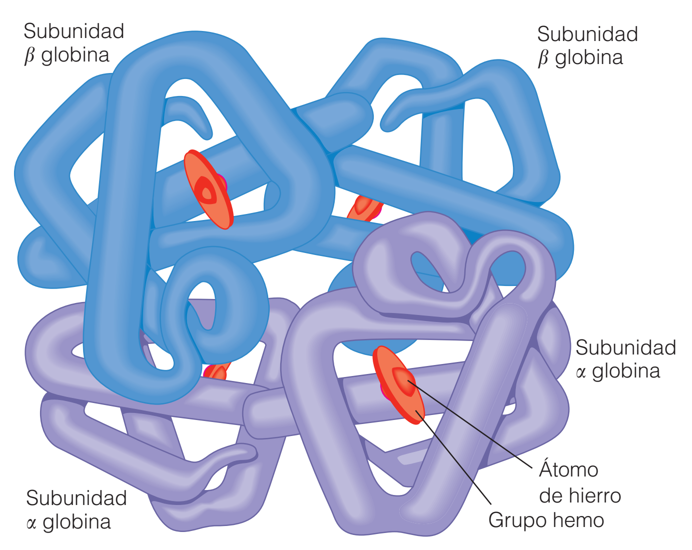


Figura 3.4 Estructura de la hemoglobina. La hemoglobina es una proteína multimérica formada por cuatro subunidades de globina (dos polipéptidos α y otros dos β). Cada subunidad porta un grupo hemo con un átomo de hierro. El hierro del hemo puede unir una molécula de oxígeno.

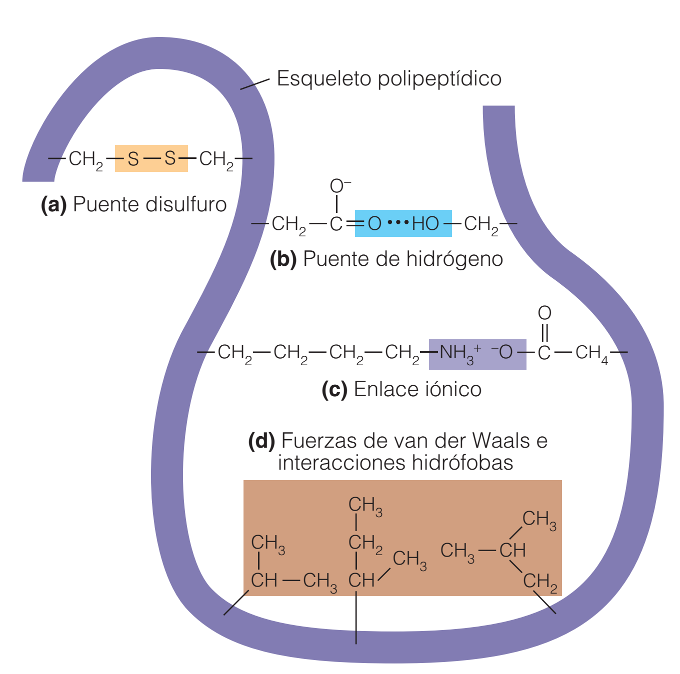


Figura 3.5 Enlaces e interacciones implicadas en el plegamiento y estabilidad de una proteína. El plegamiento inicial y la subsiguiente estabilización de un polipéptido dependen de (**a**) puentes disulfuro covalentes y otros enlaces e interacciones no covalentes, que incluyen a (**b**) puentes de hidrógeno, (**c**) enlaces iónicos, (**d**) interacciones de van der Waals e interacciones hidrófobas.

En los plegamientos y estabilización de las proteínas intervienen diferentes tipos de enlaces e interacciones

Como ya se señaló en el Capítulo 2, los plegamientos correctos de un polipéptido, es decir, su **conformación**, dependen de diferentes tipos de enlaces e interacciones, responsables además de que dicha conformación se mantenga. En la Figura 3.8 se muestran los enlaces e interacciones más importantes, incluyendo los enlaces covalentes disulfuro y varias interacciones no covalentes.

El **puente disulfuro** es el enlace covalente más común entre los que estabilizan la conformación de una proteína. Se forma cuando los grupos sulfhidrilo de dos residuos de cisteína reaccionan oxidativamente (Figura 3.5). Una vez formado, el puente disulfuro confiere al péptido una estabilidad considerable, dada su naturaleza covalente. De hecho, sólo puede ser roto reduciéndolo de nuevo y regenerando los dos sulfhidrilos. En muchos casos, los residuos de cisteína implicados en un puente disulfuro dado están en el mismo polipéptido, generalmente, bastante alejados entre sí, pero yuxtapuestos durante el proceso de plegamiento. Estos *puentes disulfuro intramoleculares* estabilizan la conformación del polipéptido, como ocurre en el caso de la ribonucleasa, la proteína monomérica que presentamos en el Capítulo 2 (*véase* Figura 2.18). En el caso de las proteínas multiméricas, el enlace disulfuro se puede formar entre residuos de cisteína localizados en diferentes polipéptidos. Estos *puentes disulfuro intermoleculares* unen covalentemente a los dos polipéptidos. La hormona insulina es una proteína dimérica que tiene sus dos subunidades unidas de esta manera (*véase* Figura 3.7 en la página 58).

Pese a la importancia de los puentes disulfuro en el mantenimiento de la estructura proteica, las **interacciones** y los **enlaces no covalentes** son incluso más determinantes, principalmente porque son muy diversos y numerosos. Como ya señalamos brevemente en el Capítulo 2, en este grupo se incluyen los *puentes de hidrógeno*, los *enlaces iónicos*, las *interacciones de van der Waals* y las *interacciones hidrófobas* (Figura 3.5).

Puentes de hidrógeno. Los **puentes de hidrógeno** nos son familiares desde la discusión de las propiedades del agua en el Capítulo 2. En el caso de las moléculas de agua, el puente de hidrógeno se forma entre un átomo de hidrógeno unido covalentemente de una molécula de agua y un par de electrones desapareados del átomo de oxígeno en la otra molécula (*véase* Figura 2.8b). En el caso de un péptido, los puentes de hidrógeno son particularmente importantes en la estabilización de las hélices y las estructuras laminares, que son regiones esenciales en muchas proteínas, como consideraremos en breve. Además, los grupos R de muchos aminoácidos tienen grupos funcionales que son, o bien buenos donadores, o bien buenos receptores de hidrógeno, favoreciendo la formación de dichos enlaces entre residuos aminoacílicos que pueden estar distantes en la secuencia de aminoácidos, pero próximos en virtud de los pliegues del polipéptido (Figura 3.5b). Como ejemplo de buenos donantes están los grupos hidroxilo y los grupos amino, presentes en varios aminoácidos. Los grupos carbonilo y sulfhidrilo son ejemplos de buenos aceptores. Un solo

puente de hidrógeno es muy débil (unas 2-5 kcal/mol, comparado con las 70-100 kcal/mol de un enlace covalente) pero los puentes de hidrógeno son muy numerosos en las macromoléculas biológicas como las proteínas y el DNA, por lo que la suma de todos ellos genera una considerable fuerza.

Enlaces iónicos. El papel de los **enlaces iónicos** (o interacciones electrostáticas) en la estructura proteica, es fácil de entender. Dado que los grupos R de algunos aminoácidos están cargados positivamente y los grupos R de otros están cargados negativamente, el plegamiento del péptido viene dictado, en parte, por la tendencia de los grupos cargados a repeler a aquellos grupos de igual carga y a atraer a los que tienen carga opuesta (Figura 3.5 C). La intensidad de tales interacciones —unas 3 kcal/mol— les permiten ejercer la fuerza de atracción a mayores distancias que las otras interacciones no covalentes. Además, la fuerza atracción no es direccional y así, los enlaces iónicos no están limitados a ángulos definidos, como es el caso de los enlaces covalentes. Dado que los enlaces iónicos dependen de que los dos grupos permanezcan cargados, se interrumpirán si los valores de pH aumentan o disminuyen hasta valores que hagan que los grupos pierdan su carga.

Interacciones de van der Waals. Las interacciones basadas en las cargas no están limitadas a los iones. Incluso las moléculas no polares con enlaces covalentes pueden tener regiones transitoriamente cargadas positiva o negativamente. Los electrones están en constante movimiento y su distribución no siempre es simétrica en la molécula. En un momento dado, la densidad de electrones en un lado de un átomo puede ser mayor que en el otro, incluso en situaciones en las que el átomo comparte el electrón con otro átomo. Las asimetrías momentáneas en la distribución de los electrones y, por tanto, la separación de cargas en una molécula, se denominan *dipolos*. Cuando dos moléculas que presentan estos dipolos transitorios están muy juntas y se orientan de forma apropiada, se atraen mutuamente, si bien sólo mientras la distribución asimétrica de los electrones persista en ambas. La atracción transitoria entre dos moléculas no polares se denomina **interacción de van der Waals**, o *fuerza de van der Waals* (Figura 3.5d). Cada una de estas interacciones no sólo es transitoria; sino también muy débil —habitualmente de 0,1 a 0,2 kcal/mol— y sólo es eficaz cuando las dos moléculas están muy juntas —menos de 0,2 nm—. Las interacciones de van der Waals son, pese a todo, importantes en la estructura de las proteínas y otras macromoléculas biológicas, así como en la unión de dos moléculas con superficies complementarias.

Interacciones hidrófobas. El cuarto tipo de interacción no covalente, que desempeña un papel en el mantenimiento de la conformación proteica son las **interacciones hidrófobas**, si bien éstas no son interacciones en sentido estricto. En realidad es la tendencia que tienen a agruparse las moléculas hidrófobas, o parte de ellas, al ser excluidas de interacciones con el agua (Figura 3.5d). Como ya hemos señalado, las cadenas laterales de los 20 aminoácidos varían notablemente en su afinidad por el agua. Algunas de ellas tienen grupos R que son hidrófilos y, por tanto, capaces de formar puentes de hidrógeno no sólo unos con otros, sino también con las moléculas de agua del medio. Lógicamente, estos grupos tienden a localizarse cerca de la superficie de un polipéptido plegado, donde pueden interaccionar eficazmente con las moléculas de agua que los rodean. Otros aminoácidos tienen grupos R hidrófobos y son esencialmente no polares. Estos tienden a aparecer hacia el interior del polipéptido, donde interaccionan unos con otros en un medio esencialmente no acuoso. La tendencia de los grupos hidrófobos a ser excluidos de la superficie acuosa de los polipéptidos, se debe a interacciones hidrófobas.

Así pues, la estructura proteica es, en parte, el resultado de un balance entre la tendencia de los grupos hidrófilos a exponerse a un ambiente acuoso cerca de la superficie de la molécula y la de los grupos hidrófobos a evitar el contacto con el agua, asociándose unos con otros en el interior de esa molécula. Si todos o la mayoría de los aminoácidos de una proteína fuesen hidrófobos, la proteína sería virtualmente insoluble en agua y aparecería en un ambiente no polar. Ésta es la razón por la que las proteínas de membrana aparecen embutidas en ella. De forma análoga, si todos o la mayoría de los aminoácidos fueran hidrófilos, el polipéptido adoptaría una forma aleatoria, distendida, permitiendo el máximo acceso posible de cada aminoácido al ambiente acuoso. Pero precisamente porque la mayoría de las cadenas polipeptídicas tienen aminoácidos, tanto hidrófobos, como hidrófilos, en un orden genéticamente establecido, unas partes de la molécula se dirigen hacia la superficie, mientras que otras se dirigen hacia el interior.

En resumen, la estabilidad de la estructura del polipéptido depende de la intervención de los puentes disulfuro covalentes y de cuatro atracciones no covalentes: puentes de hidrógeno entre los grupos laterales que son buenos donantes o aceptores, enlaces iónicos entre aminoácidos con grupos R cargados, interacciones de van der Waals entre aminoácidos no polares con asimetrías electrónicas transitorias y, por último, interacciones hidrófobas, que empujan a los grupos no polares hacia el interior de la molécula. La conformación final del polipéptido completamente plegado, es la integración de esas fuerzas y tendencias. Cada uno de los enlaces tiene una energía relativamente baja. Un puente de hidrógeno, por ejemplo, tiene sólo entre un 3 y un 5% de la energía de un enlace covalente. Pero dado que hay tantos de estos puentes entre las múltiples cadenas laterales de los cientos de aminoácidos que pueden conformar un polipéptido, la fuerza acumulada es suficiente para conferir una gran estabilidad al polipéptido plegado.

La estructura de las proteínas depende de la secuencia e interacciones de los aminoácidos

La estructura de una proteína es generalmente descrita en cuatro niveles jerárquicos de organización: *estructuras primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria* (Tabla 3.4). La estructura primaria hace referencia a la secuencia aminoacílica, mientras que los niveles más altos de organización conciernen a la interacción entre los grupos R de los aminoácidos, que dan a la proteína su conformación característica, es decir, la disposición tridimensional de los átomos en el espacio (Figura 3.6).

La estructura secundaria es debida a las interacciones entre aminoácidos contiguos de la cadena, mientras que la estructura terciaria implica interacciones a larga distancia entre aminoácidos de diferentes partes de la molécula. La estructura cuaternaria, por otra parte, compromete a interacciones entre dos o más polipéptidos, para formar una única proteína multimérica. Estas tres estructuras de orden superior están dictadas por la estructura primaria, si bien cada una de ellas tiene importancia en sí misma. Las estructuras secundaria y terciaria son, obviamente, las responsables de la conformación de un polipéptido individual, mientras que la estructura cuaternaria sólo se alcanza en proteínas formadas por más de un polipéptido.

Estructura primaria. Como se ha indicado, la **estructura primaria** de una proteína es simplemente una designación formal de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido (Figura 3.6a). Cuando describimos la estructura primaria de una proteína, estamos especificando el orden en el que

Tabla 3.4 Niveles de organización en la estructura de las proteínas

Nivel estructural	Estructura basada en	Tipos de enlaces e interacciones implicadas
Primaria	Secuencia aminoacílica	Enlace covalente peptídico
Secundaria	Plegamientos en hélices α, laminas β o al azar	Puentes de hidrógeno
Terciaria	Pliegues tridimensionales de una cadena polipeptídica	Puentes disulfuro, puentes de hidrógeno, enlaces iónicos, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas
Cuaternaria	Asociación de dos o más polipéptidos plegados para formar una proteína multimérica	Los mismos que para la estructura terciaria

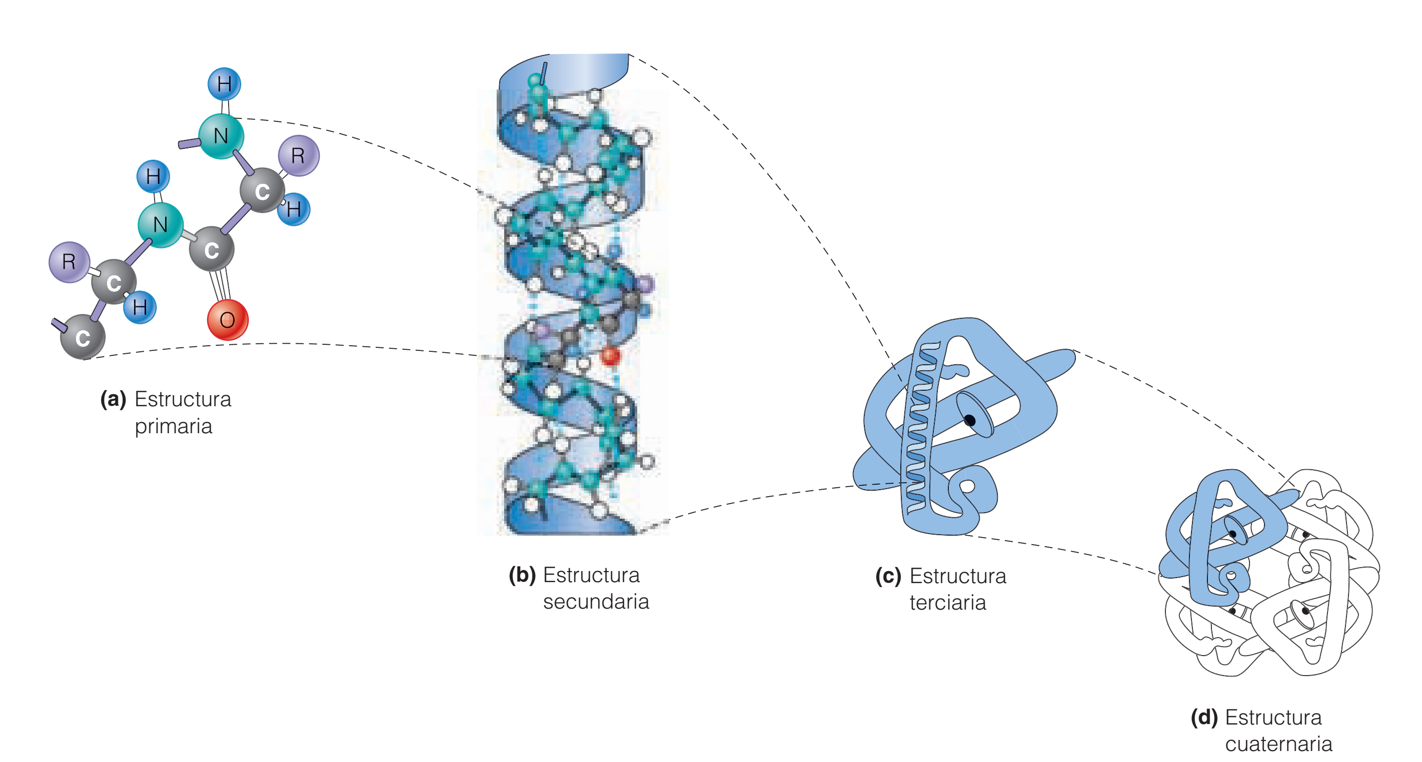


Figura 3.6 Los cuatro niveles de organización de la estructura proteica. (**a**) La estructura primaria de una proteína consiste en su secuencia de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. (**b**) El polipéptido resultante puede enrollarse formando una hélice α, que es una de las manifestaciones de la estructura secundaria. (**c**) La hélice α es, a su vez, parte de la estructura terciaria del polipéptido enrollado y plegado. Éste constituye cada una de las subunidades que forman la estructura cuaternaria (**d**) de una proteína multimérica, en nuestro ejemplo la proteína transportadora de oxígeno hemoglobina.

aparecen los aminoácidos desde un extremo al otro de la molécula. Por convención, la secuencia de aminoácidos se escribe siempre desde el extremo N-terminal al C-terminal del polipéptido, que es precisamente el sentido en el que el se sintetiza. Una vez que se incorpora en la cadena polipeptídica, cada aminoácido se denomina *residuo aminoacílico*.

La primera proteína en ser secuenciada completamente fue la hormona *insulina*. En 1956, Frederick Sanger comunicó este importante avance técnico, por el cual recibió el Premio Nobel. Para ello, Sanger fraccionó la insulina en pequeños trozos, analizando el orden de aminoácidos en estos fragmentos individuales. La insulina está formada por dos polipéptidos determinados, *subunidad* A y *subunidad* B, con 21 y 30 residuos aminoacílicos, respectivamente. La Figura 3.7 muestra la estructura primaria de la insulina, con cada una de sus subunidades escritas desde su extremo N-terminal al C-terminal. Obsérvese también el puente disulfuro (—S—S—) entre dos residuos de cisteína de la cadena A y los dos puentes disulfuro que unen las cadenas A y B. Como veremos en breve, los puentes disulfuro desempeñan un papel esencial en la estabilización de la estructura terciaria de muchas proteínas.

La técnica de Sanger permitió la secuenciación de centenares de proteínas y sirvió de base para la construcción de aparatos que pueden determinar automáticamente la secuencia de aminoácidos. En la actualidad, se emplea una estrategia alternativa, basada en la comprensión del código de la secuencia de aminoácidos, que está a su vez contenido en la secuencia del DNA. Una vez se ha determinado la secuencia de nucleótidos de un fragmento de DNA, se puede inferir el polipéptido que codifica. Las bases de datos computerizadas contienen miles de secuencias aminoacílicas, lo cual facilita su comparación en la búsqueda de regiones similares entre polipéptidos.

La estructura primaria de una proteína es importante, tanto genética, como estructuralmente. Desde el punto de vista genético, la secuencia de aminoácidos deriva directamente del orden en el que están dispuestos los nucleótidos en el correspondiente RNA mensajero. A su vez el RNA mensajero está codificado por el DNA que representa el gen de esa proteína y, en definitiva, la estructura primaria de la proteína, es el resultado inevitable del orden de los nucleótidos del DNA en el gen.

Desde el punto de vista estructural, las configuraciones de orden superior —secundaria, terciaria y cuaternaria— son consecuencia directa de la estructura primaria. Esto significa que mucha (aunque para algunas proteínas, no toda) de la información necesaria para especificar cómo se debe plegar y enrollar la cadena polipeptídica y, en su caso, cómo debe interaccionar con otros polipéptidos, es algo inherente a la secuencia de aminoácidos. Así pues, si se construyen polipéptidos con las secuencias correspondientes a las subunidades α y β de la hemoglobina, éstos asumirán la conformación tridimensional apropiada e interaccionarán espontáneamente en la forma correcta, dando lugar al tetrámero $\alpha_2\beta_2$ que conocemos como hemoglobina (*véase* Figura 3.4).

Estructura secundaria. La estructura secundaria de una proteína surge de la existencia de patrones repetitivos de una estructura local. Estos patrones son el resultado de la existencia de puentes de hidrógeno entre los átomos implicados en el enlace peptídico, a lo largo del esqueleto del polipéptido (Figura 3.8a). Las interacciones locales son las responsables de las dos principales conformaciones secundaria, denominadas **hélice** α y **lámina** β (Figura 3.8).

La estructura en hélice α fue propuesta en 1951 por Linus Puling y Robert Corey. Como se ve en la Figura 3.8a, una hélice α tiene forma espiral, con los enlaces peptídicos formando el eje y los grupos R de los aminoácidos proyectándose hacia el exterior. Las formas helicoidales son frecuentes en polímeros repetitivos, como veremos cuando analicemos los ácidos nucleicos y los polisacáridos. En una hélice α, hay 3,6 aminoácidos por vuelta, por lo que los enlaces peptídicos de cada cuatro aminoácidos, aparecen muy próximos entre sí. La distancia entre esos enlaces peptídicos yuxtapuestos es, de hecho, la necesaria para que se forme un puente de hidrógeno entre el *grupo imino* (—NH—) de un enlace peptídico y el *grupo carbonilo* (—CO—) del otro, como se ve en la Figura 3.8a.

Como resultado, cada enlace peptídico en la hélice está unido por un puente de hidrógeno de su grupo carbonilo al enlace peptídico inmediatamente por «debajo» en la es-

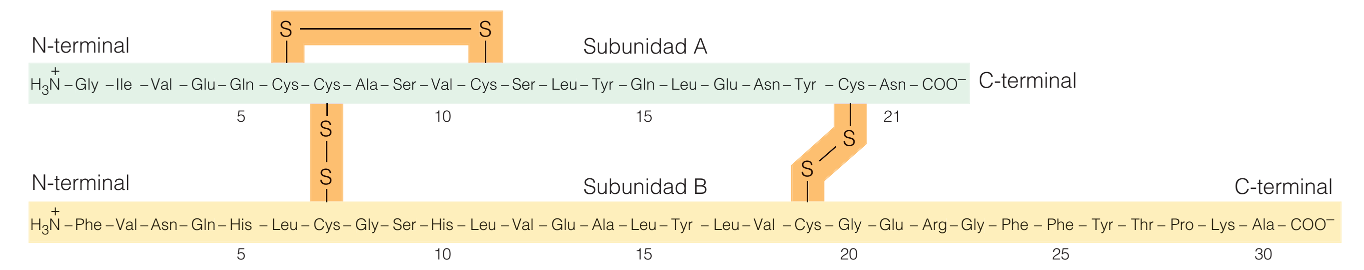


Figura 3.7 Estructura primaria de la insulina. La insulina está formada por dos polipéptidos denominados subunidades A y B, mostradas aquí desde el extremo N-terminal al C-terminal. Las subunidades se unen entre sí covalentemente por dos puentes disulfuro. (Para las abreviaturas de los aminoácidos, consúltese la Tabla 3.3.)

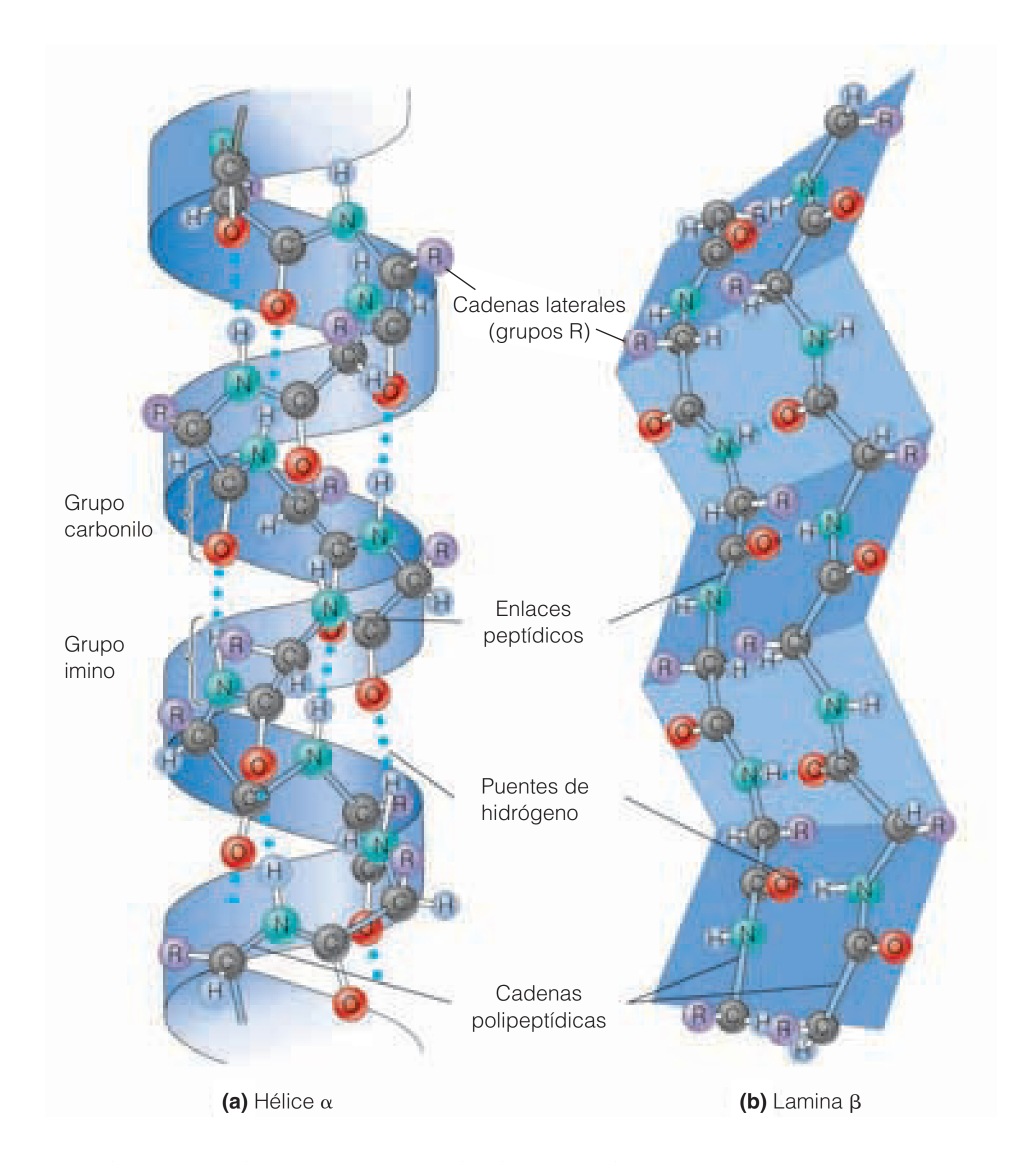


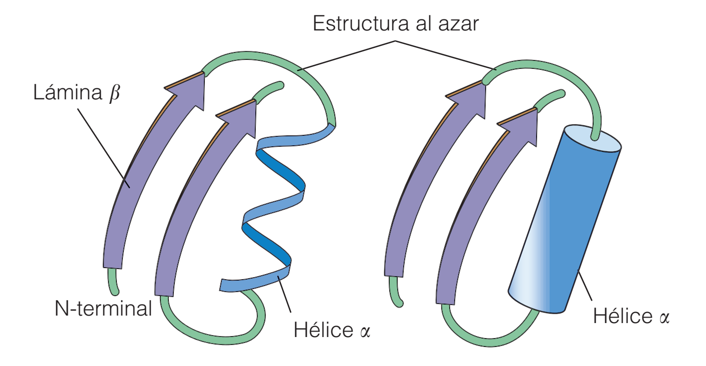
Figura 3.8 La hélice α y la lámina β. La hélice α y la lámina β son los dos elementos más importantes en la estructura secundaria de las proteínas. (**a**) La hélice α recuerda a un cable telefónico, con cada vuelta estabilizada por puentes de hidrógeno (puntos azules) entre los grupos carbonilo e imino de un enlace peptídico y los correspondientes de los enlaces peptídicos situados por «encima» y «debajo» en la hélice. Así, los puentes de hidrógeno de una hélice α son paralelos al eje de la hélice. (**b**) La lámina β recuerda a una falda tableada, con los sucesivos átomos de cada cadena polipeptídica localizados en las depresiones y en las cúspides, y proyectando los grupos R de los aminoácidos, alternativamente, a uno y otro lado de la lámina. La estructura se estabiliza por puentes de hidrógeno (puntos azules) entre los grupos carbonilo e imino de los enlaces peptídicos de los polipéptidos adyacentes (o segmentos próximos del mismo polipéptido). En la estructura que se muestra aquí, los puentes de hidrógeno se establecen entre dos cadenas polipeptídicas, pero las láminas β también se pueden formar dentro de un mismo péptido, cuando partes de éste se pliegan, discurriendo unas junto a las otras.

piral y, a través de su grupo imino al enlace peptídico justo por «encima» de él. En cada caso, sin embargo, los enlaces peptídicos unidos por puentes de hidrógeno están separados en la secuencia lineal por tres aminoácidos, requeridos para que la hélice avance lo suficiente para permitir que los dos enlaces aparezcan yuxtapuestos. De esta manera, los puentes de hidrógeno aparecen casi paralelos al eje principal de la hélice y, por tanto, tienden a estabilizar la estructura espiral, manteniendo juntas las vueltas de hélice sucesivas.

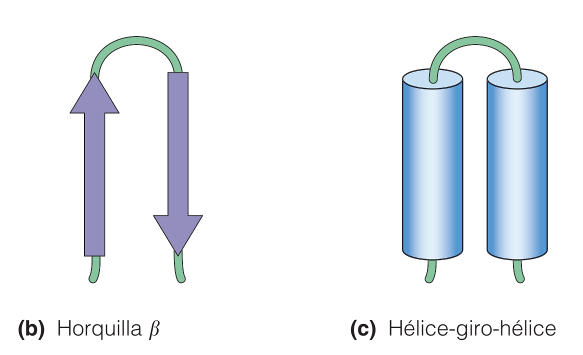
La principal alternativa a la hélice α es la lámina β, también propuesta por Pauling y Corey. Como se muestra en la Figura 3.7b, esta estructura se extiende como una lámina corrugada, con los sucesivos átomos de la cadena polipeptídica ocupando las crestas y los valles. Los grupos R de los aminoácidos se proyectan, de forma alternante, a ambos lados de la lámina.

La lámina β, al igual que la hélice α, se caracteriza por la abundancia de puentes de hidrógeno. En ambos casos aparecen implicados todos los grupos imino y carboxilo de los enlaces peptídicos. Sin embargo, los puentes de hidrógeno en una hélice α son, invariablemente, intramoleculares, es decir, dentro del mismo péptido, mientras que en la lámina β, pueden ser, tanto intramoleculares (entre los segmentos yuxtapuestos de un mismo polipéptido), como intermoleculares (uniendo enlaces peptídicos de dos polipéptidos adyacentes). Las zonas proteicas que forman láminas β pueden interaccionar de dos maneras. Si las dos regiones de interacción se disponen en el mismo sentido N-terminal a C-terminal, la estructura es *una lámina β paralela*; si las dos regiones aparecen en sentidos opuestos, la estructura se denomina *lámina β antiparalela*. Dado que los átomos de carbono que constituyen el eje de la cadena polipeptídicas están sucesivamente localizados por encima y debajo del plano de la lámina, estas estructuras son también a veces llamadas, *láminas β tableadas* (haciendo alusión a este tipo de falda).

Para mostrar regiones estructurales concretas de una proteína, los bioquímicos han adoptado la convención que se muestra en la Figura 3.9a. Una región en hélice α se representa como una *espiral* (a la izquierda) o un *cilindro* (a la derecha), mientras que una región en lámina β, es esque-



(a) Motivo β-α-β con la hélice α representada como una espiral (izquierda) o un cilindro (derecha)



(b) Horquilla β **(c)** Hélice-giro-hélice

Figura 3.9 Motivos estructurales característicos. Los tres motivos más frecuentes de la estructura secundaria son el (**a**) β-α-β, (**b**) la horquilla β y (**c**) la hélice-giro-hélice. Las hélices α pueden ser representadas, tanto por una espiral (a, izquierda), como por un cilindro (a, derecha), mientras que una lámina β se representa con una cinta o una flecha plana. Los segmentos cortos que interconectan las hélices α y las láminas β son regiones con estructura al azar. En cada diagrama sólo se muestra una pequeña porción de la proteína.

matizada como una cinta o una fecha plana apuntando en la dirección del extremo C-terminal. Un segmento en forma de lazo que conecta regiones en hélice α y/o lámina β, se denomina *giro al azar* y se muestra como una *cinta estrecha.*

Ciertas combinaciones de hélices α y láminas β son características de muchas proteínas. Estas unidades de estructura secundaria, llamadas **motivos**, están constituidas por pequeños segmentos de hélices y láminas, conectados uno al otro por lazos de longitud variable. Entre los motivos más frecuentes, están el β-α-β, mostrado en la Figura 3.9a y la horquilla β y la hélice-giro-hélice, mostrados en las Figuras 3.9b y c, respectivamente. Cuando el mismo motivo está presente en diferentes proteínas, suele desempeñar una misma función. Por ejemplo, el motivo hélice-giro-hélice es característico de proteínas que se unen al DNA y que encontraremos en el Capítulo 23, cuando consideremos la regulación de la expresión génica.

Estructura terciaria. La **estructura terciaria** de una proteína es más fácil de entender al compararla con la estructura secundaria (Figura 3.6b y c). La estructura secundaria es una conformación predecible, de patrón repetitivo que deriva de la naturaleza precisamente repetitiva del polipéptido, pues se basa en la formación de puentes de hidrógeno entre los enlaces peptídicos —los elementos estructurales comunes a lo largo de toda cadena polipeptídica—. Si todas las proteínas tuvieran sólo uno o unos pocos aminoácidos parecidos, prácticamente todos los aspectos de la conformación proteica podrían ser comprendidos en términos de estructura secundaria, con muy pocas variaciones entre proteínas.

La estructura terciaria aparece, precisamente, por la variedad de aminoácidos presentes en las proteínas y las diferencias existentes entre sus grupos R. De hecho, la estructura terciaria depende esencialmente de las interacciones entre estos grupos R, con independencia de su posición en la estructura primaria. En suma, refleja aspectos no repetitivos del polipéptido, puesto que no depende de los grupos carboxilo y amino propios de todos los aminoácidos, sino de lo que hace diferente a cada aminoácido —el grupo R—.

La estructura terciaria no es repetitiva ni predecible; se basa en interacciones entre grupos laterales con diferentes propiedades. Por ejemplo, los grupos hidrófobos tienden a asociarse unos a otros y a buscar, de forma espontánea, ambientes no acuosos en el interior de la molécula, mientras que los aminoácidos polares buscan la superficie, en parte por su afinidad mutua y en parte por la atracción ejercida por las moléculas polares de agua del medio. Como resultado, la cadena polipeptídica se plegará, enrollará y girará en su **conformación nativa**, que es la forma más estable para una determinada secuencia de aminoácidos. Como se vio en el Capítulo 2, los pliegues ocurren de forma espontánea en algunos polipéptidos, mientras que otros necesitan de la asistencia de proteínas denominadas *chaperonas moleculares.* Una vez que la estructura terciaria de un polipéptido se ha alcanzado, se estabiliza y mantiene por varios tipos de enlaces no covalentes e interacciones, mostrados en la Figura 3.5 y por puentes disulfuro covalentes, si es que están presentes.

La contribución relativa de las estructuras secundaria y terciaria a la forma de un polipéptido, varía de una proteína a otra, y depende de la proporción relativa y de la secuencia de aminoácidos de la cadena. En términos generales, las proteínas pueden ser divididas en dos categorías, *fibrilares* y *globulares.*

Las **proteínas fibrilares** presentan estructuras secundarias definidas (hélices α o láminas β), repetitivas y altamente ordenadas. En general, la estructura secundaria es más importante que la terciaria en la determinación de la forma de la proteína, que a menudo adopta aspecto filamentoso. Como ejemplo de proteínas fibrilares están la *fibroína* de la seda y las *queratinas* de la piel y la lana, así como el *colágeno* (presente en los tendones y en la piel) y la *elastina* (propia de ligamentos y vasos sanguíneos).

La secuencia aminoacílica de cada una de esas proteínas favorece un tipo particular de estructura secundaria,

que a su vez confiere un conjunto específico de propiedades mecánicas a dicha proteína. La fibroína, por ejemplo, está formada por bandas amplias de láminas β, con las cadenas polipeptídicas discurriendo paralelamente al eje de la fibra de la seda. Los aminoácidos más abundantes en la fibroína son la glicina, la alanina y la serina. Estos aminoácidos tienen grupos R pequeños, que pueden empaquetarse estrechamente (Figura 3.2). El resultado es una fibra de seda resistente y relativamente inextensible, puesto que las cadenas, unidas covalentemente, aparecen extendidas hasta casi su máxima longitud posible.

Las fibras del pelo y la lana, por otra parte, están constituidas por la proteína α-queratina, que es helicoidal en su práctica totalidad. Las moléculas individuales de queratina son muy largas y se sitúan con el eje de sus hélices casi paralelo al eje de la fibra. Como resultado, el pelo es relativamente extensible, pues la hélice α está estabilizada por puentes de hidrógeno y no por enlaces covalentes como en las láminas β de la seda. Las hélices α del pelo se trenzan en forma de soga, como se muestra en la Figura 3.10. En primer lugar, se unen tres hélices formando una protofibrilla. Las microfibrillas se forman por agregación lateral de once protofibrillas. Por último, las microfibrillas se empaquetan formando las macrofibrillas, que son los haces que atraviesan y rodean a las células formadoras del pelo.

Pero por muy importantes que sean las proteínas fibrilares, sólo representan una pequeña fracción de los tipos de proteínas presentes en la mayoría de las células. Casi todas las proteínas estructurales de la célula son de **tipo globular**, llamadas así porque sus cadenas polipeptídicas se pliegan formando estructuras compactas. La cadena polipeptídica de una proteína globular se dobla, generalmente, en regiones con estructura en hélice α o lámina β, que a su vez se repliegan sobre sí mismas dando lugar a la forma compacta y globular característica. Estos plegamientos son posibles porque las regiones en hélice α o lámina β están separadas por segmentos de estructura aleatoria, que facilitan la formación de lazos y dobleces (Figura 3.9). Así, cada proteína globular tiene su propia estructura terciaria, hecha de elementos estructurales secundarios (hélices y láminas), plegados de una forma específica, que le confieren su función particular.

La presencia de segmentos en hélice α, lámina β, o la ausencia de ambas, depende de los aminoácidos presentes en dicho segmento. Por ejemplo, la leucina, la metionina y el glutamato son «formadores de hélices», mientras que la isoeucina, la leucina, la valina y la fenilalanina son «formadoras de láminas». La glicina y la prolina, el único aminoácido cíclico, son «rompedores de hélices» y, de hecho, responsables de los dobleces y giros en las hélices α. Tales giros suelen aparecer en la superficie del polipéptido.

La Figura 3.11 muestra la estructura terciaria de una proteína globular típica, la enzima ribonucleasa. (Recuérdese que la ribonucleasa fue una de las primeras proteínas en ser secuenciada. La hemos visto también en la Figura 2.18 para ilustrar los fenómenos de desnaturalización y renaturalización de un polipéptido y la espontaneidad de sus plegamientos). La estructura de la ribonucleasa puede representarse de dos maneras: según el modelo de *esferas y varillas* o el modelo de *espirales y cintas*, que vimos en la Figura 3.9. La mayoría de las cadenas laterales de la ribonucleasa han sido omitidas en ambos modelos, para aumentar la claridad. Los grupos de color dorados de la Figura 3.11a son los cuatro puentes disulfuro que ayudan a estabilizar la estructura tridimensional de la ribonucleasa (*véase* Figura 2.18a).

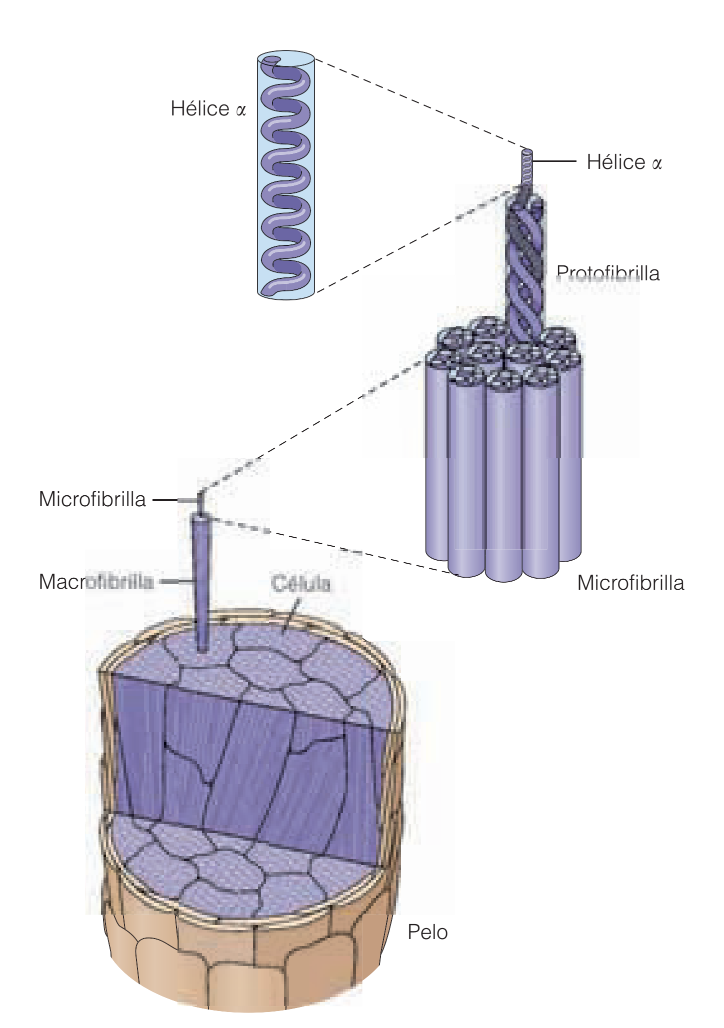
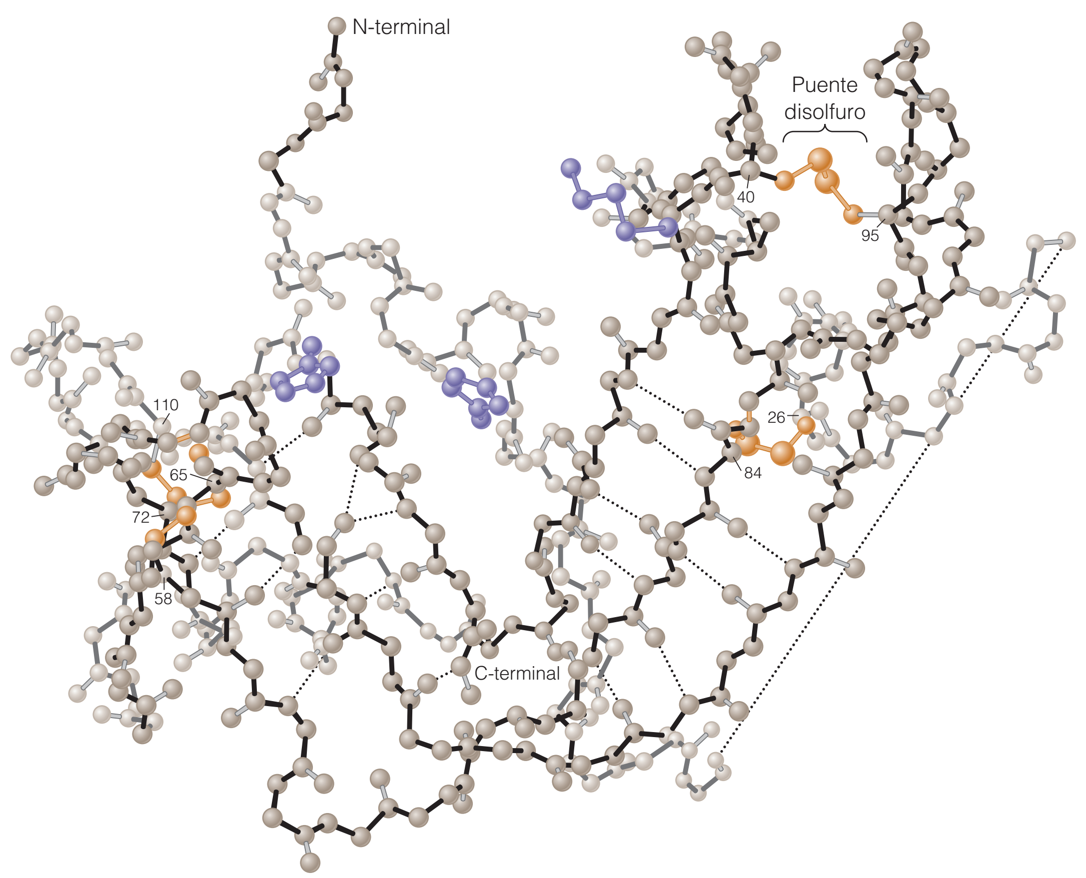
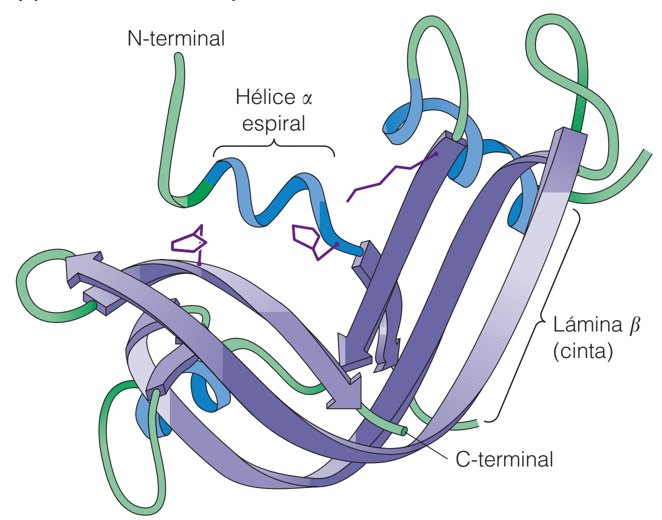


Figura 3.10 La estructura del pelo. La principal proteína estructural del pelo es la queratina α, proteína fibrosa con estructura de hélice α. Tres hélices de queratina α se enrollan formando una protofibrilla, que junto con otras protofibrillas da lugar a la microfibrilla. Las microfibrillas tienen una estructura peculiar «9 + 2», con dos protofibrillas centrales y 9 periféricas. Las microfibrillas, a su vez, se asocian lateralmente formando las macrofibrillas. Por último, los haces de macrofibrillas atraviesan y rodean a las células formadoras del pelo.

En las proteínas globulares pueden predominar hélices α, láminas β, o bien coexistir ambas estructuras. Estas categorías se ilustran en la Figura 3.12 con la proteína del virus del mosaico del tabaco (TMV), con un fragmento de



(a) Modelo de esferas y varillas

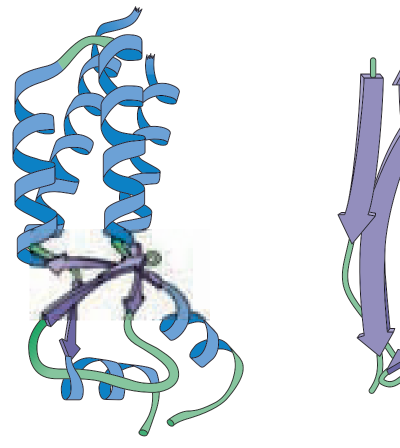


(b) Modelo de espirales y cintas

Figura 3.11 Estructura tridimensional de la ribonucleasa. La ribonucleasa es la típica proteína globular con varios segmentos en hélice α y lámina β, conectados por regiones al azar. (**a**) Modelo de esferas y varillas con los puentes disulfuro en dorado y cada una de las cisteínas relevantes identificada por su número en la secuencia aminoacílica. Los únicos grupos laterales (R) mostrados son los de dos histidinas y una lisina que son esenciales para la actividad catalítica de la enzima (en morado). (**b**) Modelo alternativo en el que las regiones en hélice α se representan como espirales y las regiones en lámina β como cintas rematadas en flechas que apuntan hacia el extremo C-terminal. Los grupos R de los aminoácidos y los puentes disulfuro se han omitido por motivos de claridad. Nótese que las láminas β son antiparalelas (las bandas adyacentes apuntan en sentido opuesto) y están fuertemente giradas.

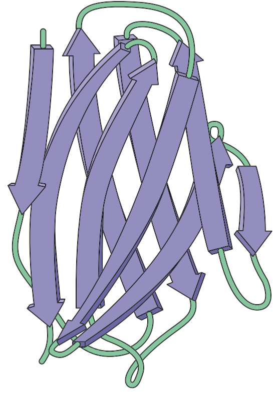
una molécula de una inmunoglobulina y con una porción de la enzima hexoquinasa. Los segmentos helicoidales de las proteínas globulares, a menudo consisten en haces de hélices, como se ve en la proteína de la cápsula del TMV de la Figura 3.12a. Las regiones con predominio de láminas β suelen caracterizarse por configuraciones en forma de barril (Figura 3.12b) o por una lámina retorcida (Figura 3.12c).

La mayoría de las proteínas globulares están formadas por una serie de segmentos denominados dominios. Un **dominio** es un territorio discreto de estructura terciaria, que a menudo contiene regiones en hélice α y lámina β empaquetadas de forma compacta. Un dominio típico está formado por unos 50-350 aminoácidos y tiene una función específica. Las proteínas globulares pequeñas tienden a plegarse en un único dominio, como se muestra



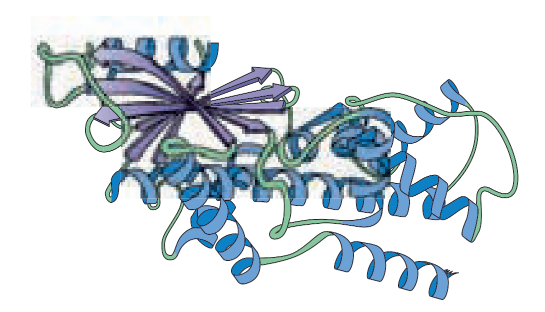
Proteínas de la cubierta del virus del mosaico del tabaco

(a) Predominante hélice α



Dominio V_2 de las inmunoglobulinas

(b) Predominante lámina β



Dominio 2 de la hexoquinasa

(c) Hélice α y lámina β alternantes

Figura 3.12 Estructura de diferentes proteínas globulares. En esta figura se muestran proteínas con diferentes estructuras terciarias: (**a**) en la proteína de la cápsula del virus del mosaico del tabaco (TMV), predomina la conformación en hélice α (espirales azules); (**b**) en el dominio V_2 en las inmunoglobulinas, la conformación principal es la lámina β (cintas moradas con fechas); (**c**) en el dominio 2 de la hexoquinasa alternan las estructuras en hélice α y en lámina β. El dominio V_2 de la inmunoglobulina es un ejemplo de estructura antiparalela en barril β. (Las porciones verdes son segmentos de estructura al azar.)

en la Figura 3.11b para la ribonucleasa, una proteína relativamente pequeña. Las proteínas globulares grandes suelen tener múltiples dominios. Por ejemplo, las porciones de las moléculas de la inmunoglobulina y la hexoquinasa mostradas en la Figura 3.12b y c son, de hecho, dominios específicos de dichas proteínas (respectivamente, el dominio V_2 de las inmunoglobulinas y el dominio 2 de la hexoquinasa). La Figura 3.13 es un ejemplo de una proteína formada por un solo polipéptido plegado en dos dominios funcionales.

Las proteínas que tienen una función común (como unir un ion metálico o reconocer a una molécula específica) suelen tener un dominio común. Es más, las proteínas multifuncionales suelen tener dominios separados para cada función. En suma, los dominios pueden ser considerados como unidades modulares de función, de las cuales están formadas las proteínas globulares.

Para terminar con el apartado de la estructura terciaria, debemos recalcar de nuevo la dependencia que tiene esta organización de nivel superior de la estructura primaria del polipéptido. La importancia de la estructura primaria se comprueba especialmente bien en la patología hereditaria conocida como *anemia falciforme.* En los individuos afectados, los eritrocitos presentan forma de «hoz» en lugar de la forma discoidal habitual, circunstancia que facilita que las células formen coágulos dentro de los vasos, dificultándose el flujo sanguíneo. Esta condición está causada por un cambio mínimo en la hemoglobina de los eritrocitos. Las moléculas de hemoglobina tienen cadenas α normales, pero sus cadenas β tienen un aminoácido que es diferente. En una posición específica de la cadena (el sexto residuo desde el extremo N-terminal), el glutamato está reemplazado por valina. Los otros 145 aminoácidos de la

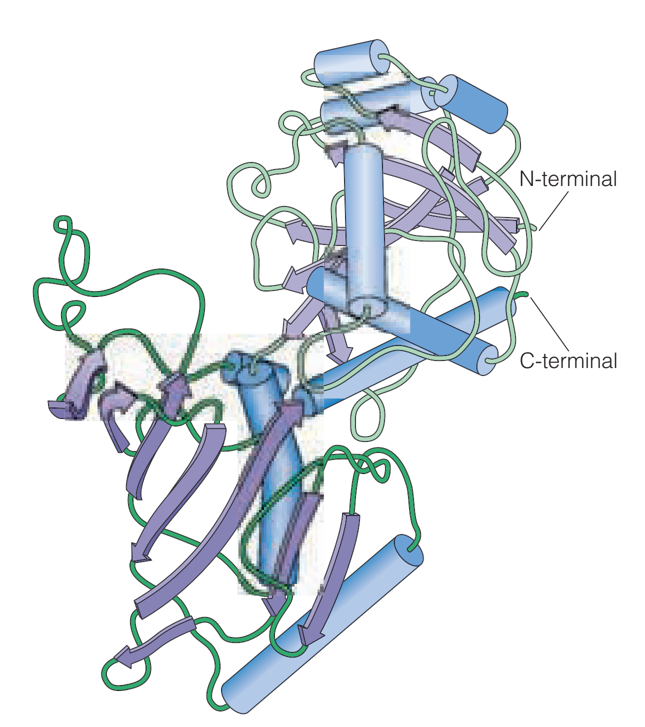


Figura 3.13 Ejemplo de una proteína con dos dominios funcionales. Este modelo de la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa muestra una única cadena polipeptídica plegada en dos dominios. Uno de los dominios se une a la sustancia que va a ser metabolizada, mientras que el otro se une a un factor químico requerido para que tenga lugar la reacción. Los dos dominios se distinguen aquí por su intensidad de color diferente.

cadena no varían, pero esta simple sustitución produce una diferencia en la estructura terciaria tal que la hemoglobina tiende a cristalizar, deformando la célula. No todas las sustituciones de aminoácidos producen cambios tan drásticos en estructura y función, pero el ejemplo sirve para ilustrar la relación crucial entre la secuencia aminoacílica de un polipéptido y la forma final (y a menudo la actividad biológica) de una molécula.

Estructura cuaternaria. La **estructura cuaternaria** de una proteína representa el nivel de organización que concierne a las interacciones y ensamblaje de sus subunidades (Figura 3.6d). La estructura cuaternaria sólo puede aplicarse a proteínas multiméricas. En esta categoría se incluyen muchas proteínas, principalmente aquellas cuyo peso molecular supera los 50.000. La hemoglobina, por ejemplo, es una proteína multimérica (*véase* la Figura 3.4). Como hemos indicado anteriormente, algunas proteínas multiméricas están formadas por subunidades idénticas; otras, como la hemoglobina, tienen dos o más polipéptidos diferentes.

Los enlaces y las fuerzas de atracción que mantienen la estructura cuaternaria son los mismos que los de la estructura terciaria: puentes de hidrógeno, atracciones electrostáticas, interacciones hidrófobas y enlaces covalentes disulfuro. Estos últimos pueden aparecer, tanto en el interior de cada cadena, como entre las diferentes cadenas. Cuando aparecen dentro de un polipéptido, estabilizan la estructura terciaria, mientras que cuando se establecen entre diferentes polipéptidos, estabilizan la estructura cuaternaria. Como en el caso de los pliegues de un polipéptido, el proceso de ensamblaje de subunidades suele ser, aunque no siempre, espontáneo y dependiente de la información contenida en la secuencia aminoacílica de cada polipéptido.

En algunos casos, existe un nivel de complejidad aún mayor, en el sentido de que dos o más proteínas (habitualmente enzimas) se organizan en un **complejo multiproteico**, en el que cada proteína colabora con las demás en un proceso común. Un ejemplo es el sistema enzimático denominado piruvato deshidrogenasa. Este complejo cataliza la pérdida de un átomo de carbono (en forma de CO_2) desde el piruvato (o ácido pirúvico), un compuesto de tres átomos de carbono. En el Capítulo 10 se analizará en detalle esta reacción. El complejo multienzimático, formado por tres enzimas y cinco tipos de moléculas distintas denominadas coenzimas, tiene una masa de 4,6 millones de daltons en células bacterianas y casi el doble en las mitocondrias de nuestras células hepáticas. (Un *dalton* es la masa de un átomo de hidrógeno, o $1{,}66 \times 10^{-24}$ g.) El complejo de la piruvato descarboxilasa es uno de los ejemplos mejor conocidos de cómo las células pueden economizar funciones, ordenando las enzimas que catalizan reacciones secuenciales en un único complejo multienzimático.

Ácidos nucleicos

Analizaremos ahora los **ácidos nucleicos**, macromoléculas fundamentales en la célula, por su papel en el almacenamiento, transmisión y expresión de la información genética. Los ácidos nucleicos son polímeros lineales de nucleótidos, enlazados siguiendo un orden determinado genéticamente, que es crucial en su papel como macromoléculas de información. Los dos tipos principales de ácidos nucleicos son el **DNA** (**ácido desoxirribonucleico**) y el **RNA (ácido ribonucleico).** El DNA y el RNA difieren química y funcionalmente en la célula. Como sugiere su nombre, el RNA contiene **ribosa**, azúcar de cinco átomos de carbono, en cada uno de sus nucleótidos, mientras que el DNA contiene desoxirribosa. Desde el punto de vista funcional, el DNA es el depositario de la información genética, y el RNA desempeña diferentes papeles en la expresión de dicha información, es decir, en la síntesis de proteínas. La Figura 3.14 esquematiza esas funciones en una célula tipo, animal o vegetal. La mayoría del DNA celular se localiza en el núcleo, que es, por tanto, el lugar principal de la síntesis del RNA. La síntesis de un *RNA mensajero (mRNA)* o transcripción, es un proceso dirigido por un segmento específico de la molécula del DNA. El mRNA se elabora en el núcleo, dirigiéndose luego hacia los poros nucleares (pequeños canales en la envuelta nuclear), desde los que accede al citoplasma. Allí, la secuencia nucleotídica del mRNA sirve para dirigir la secuencia aminoacílica de una proteína, en un proceso denominado *traducción.* La traducción se realiza en los ribosomas, que son complejos de proteínas ribosómicas y *RNA ribosómico (rRNA).* El rRNA se sintetiza también en el núcleo, igual que el RNA de transferencia (tRNA), que lleva al ribosoma a los aminoácidos correctos, conforme la cadena polipeptídica se elonga. Así pues, el mRNA, el rRNA y el tRNA son las tres principales formas del RNA.

Estas funciones del DNA y del RNA en el almacenamiento, transmisión y expresión de función genética serán consideradas en detalle en los Capítulos 18 a 22. Aquí nos centraremos en la química de los ácidos nucleicos y de los nucleótidos que los componen.

Los monómeros son los nucleótidos

Como las proteínas, los ácidos nucleicos son macromoléculas con información intrínseca, formadas por unidades monoméricas diferentes que se disponen con una secuencia determinada. Las unidades monoméricas de los ácidos nucleicos se denominan **nucleótidos**. Hay menos variedad de nucleótidos que de aminoácidos; el DNA y el RNA sólo presentan cuatro tipos diferentes de nucleótidos cada uno. (Realmente la variedad es algo mayor, especialmente en algunas moléculas de RNA; pero virtualmente todas las variantes encontradas en los ácidos nucleicos corresponden a uno de los cuatro nucleótidos básicos, que ha sido modificado químicamente después de la inserción en la cadena.)

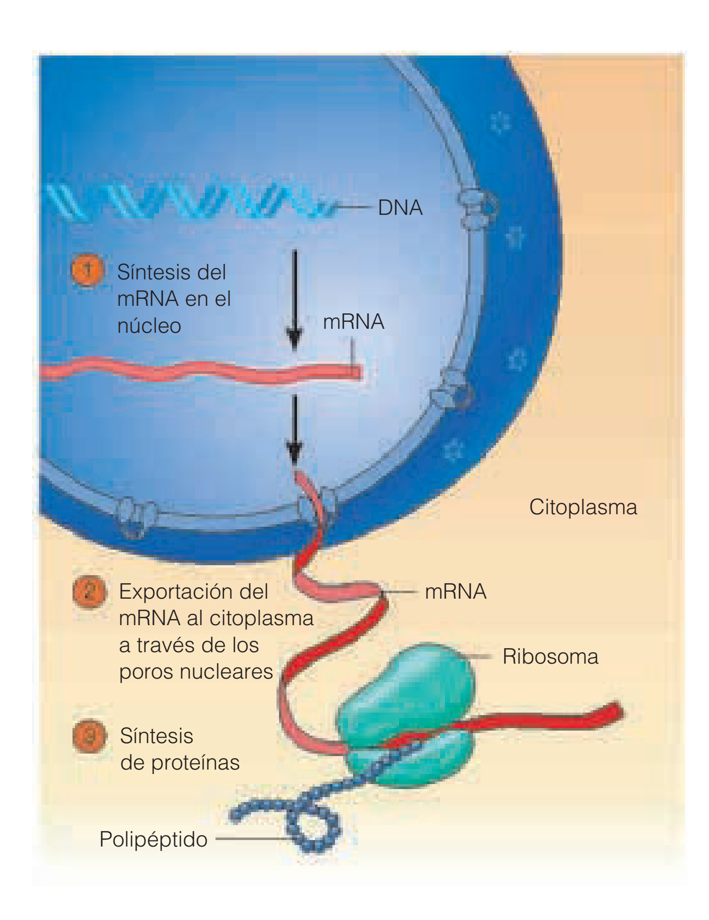


Figura 3.14 La información genética se almacena en la secuencia de nucleótidos de las moléculas del DNA. En los organismos eucarióticos (diferentes de las bacterias) la mayoría del DNA celular se localiza en el núcleo. (También hay pequeñas cantidades de DNA en los órganos denominados mitocondrias y plastidios, estos últimos exclusivos de células vegetales.) El DNA nuclear orquesta la síntesis proteica en el citoplasma, dirigiendo la síntesis del RNA mensajero (mRNA), que abandona el núcleo a través de los poros nucleares y se une a los ribosomas del citoplasma. Conforme el ribosoma se desplaza a lo largo de un mRNA determinado, el mensaje genético se traduce en un polipéptido con una secuencia aminoacílica específica. Aunque no se muestra en el diagrama, el DNA también dirige la síntesis de las moléculas de RNA ribosomal (rRNA), que son componentes estructurales del ribosoma y de las moléculas del RNA de transferencia, que llevan los aminoácidos correctos al ribosoma mientras progresa la síntesis.

Como se observa en la Figura 3.15, cada nucleótido está formado por un azúcar de cinco átomos de carbono al cual se une un grupo fosfato y una base nitrogenada. El azúcar es D-ribosa (para el RNA) o D-desoxirribosa (para el DNA). El fosfato se une por un enlace fosfoéster al carbono 5′ del azúcar y la base se une al carbono 1′. La base puede ser una **purina** o una **pirimidina.** Las purinas del DNA son la **adenina** (**A**) y la **guanina** (**G**) y las pirimidinas son la **citosina** (**C**) y la **timina** (**T**). El RNA también tiene adenina, guanina y citosina, pero en lugar de la timina tiene como pirimidina al **uracilo** (**U**). Como los 20 aminoácidos proteicos, estas cinco bases aromáticas están entre las 30 moléculas pequeñas más comunes en las células (*véase* la Tabla 3.2).

Si se quita el fosfato de un nucleótido, la molécula se denomina **nucleósido**. Cada pirimidina y cada purina pueden aparecer como bases libres, nucleósidos o nucleótidos. Los nombres de cada uno de sus compuestos figuran en la Tabla 3.5. Observe que los nucleósidos y nucleótidos que contienen desoxirribosa se identifican haciéndoles preceder por una *d* minúscula.

Como indica la nomenclatura, un nucleótido equivale a un **nucleósido monofosfato**, puesto que es un nucleósido con un único grupo fosfato unido a él. Esa terminología se extiende a las moléculas con dos o tres grupos fosfato unidos al carbono 5′. Por ejemplo, el nucleósido adenosina (adenina más ribosa) puede tener uno, dos o tres fosfatos unidos, denominándose entonces **adenosina monofosfato** (**AMP**), **adenosina difosfato** (**ADP**) o **adenosina trifosfato** (**ATP**). Las relaciones entre estos compuestos se muestran en la Figura 3.16.

Posiblemente usted reconozca al ATP como un compuesto rico en energía que se usa para favorecer una gran variedad de reacciones en la célula, como la activación de monómeros para formar polímeros, que hemos visto en el capítulo previo (*véase* la Figura 2.17). Como sugiere este ejemplo, los nucleótidos desempeña realmente dos papeles en la célula: son las unidades monoméricas de los ácidos nucleicos, y algunos de ellos, principalmente el ATP, sirven como intermediarios en muchas reacciones donde se transfiere energía.

Tabla 3.5 Bases, nucleósidos y nucleótidos del RNA y el DNA

	RNA		DNA	
Bases	**Nucleósidos**	**Nucleótidos**	**Desoxinucleósidos**	**Desoxinucleótidos**
Purinas				
Adenina (A)	Adenosina	Adenosín monofosfato (AMP)	Desoxiadenosina	Desoxiadenosín monofosfato (dAMP)
Guanina (G)	Guanosina	Guanosín monofosfato (GMP)	Desoxiguanosina	Desoxiguanosín monofosfato (dGMP)
Pirimidinas				
Citosina (C)	Citidina	Citidín monofosfato (CMP)	Desoxicitidina	Desoxicitidín monofosfato (dCMP)
Uracilo (U)	Uridina	Uridín monofosfato (UMP)	—	—
Timina (T)	—	—	Desoxitimidina	Desoxitimidín monofosfato (dTMP)

Grupo fosfato	Azúcares	Bases	
		Purinas	Pirimidinas
	D-desoxirribosa (en el DNA)	Adenina (A)	Timina (T) (en el DNA) / Uracilo (U) (en el RNA)
	D-ribosa (en el RNA)	Guanina (G)	Citosina (C)

Nucleótido

Enlace fosfoéster

Grupo fosfato

Base

Azúcares

OH ← RNA

(H) ← DNA

Figura 3.15 Estructura de un nucleótido. En el RNA, un nucleótido está formado por el azúcar D-ribosa, al cual se unen una base nitrogenada aromática a través del carbono 1′ y un grupo fosfato unido a través del carbono 5′, por medio de un enlace fosfoéster. (Los átomos de carbono del azúcar de un nucleótido se numeran de 1′ a 5′ para distinguirlos de los de la base, que se numeran sin el apóstrofe.) En el DNA, el grupo hidroxilo del carbono 2′ se reemplaza por un átomo de hidrógeno, siendo el azúcar la D-desoxirribosa. Las bases en el DNA son las purinas adenina (A) y guanina (G) y las pirimidinas timina (T) y citosina (C). En el RNA la timina es sustituida por la pirimidina uracilo (U).

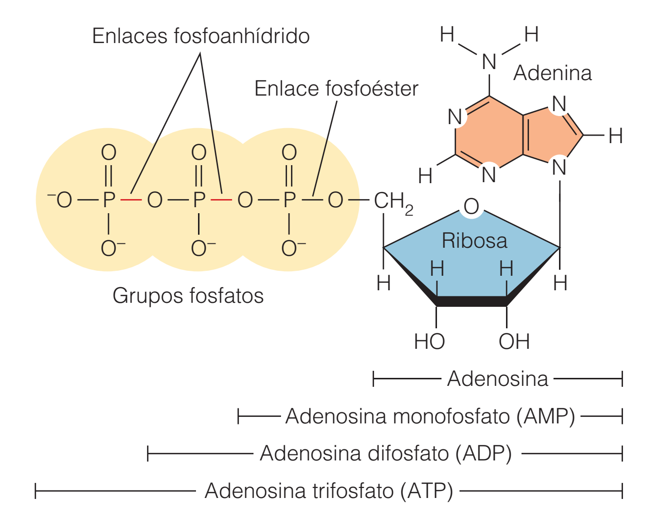


Figura 3.16 Las formas fosforiladas de la adenosina. La adenosina puede aparecer como nucleósido libre en forma de monofosfato (AMP), de difosfato (ADP) o de trifosfato (ATP). El enlace que une el primer fosfato a la ribosa es un enlace fosfoéster de baja energía, mientras que los enlaces que unen los fosfatos segundo y tercero, son enlaces fosfoanhídrido de alta energía. (Recuérdese que los términos «baja energía» y «alta energía» no se refieren a los enlaces en sí mismos, que siempre requieren energía para ser disociados, sino a la cantidad de energía libre o útil, que es liberada después de la hidrólisis del enlace. Como veremos en el Capítulo 9, la hidrólisis de un enlace fosfoanhídrido libera de 2 a 3 veces más energía libre que la hidrólisis del enlace fosfoéster.)

Los polímeros son el DNA y el RNA

Los ácidos nucleicos son polímeros lineales formados por la unión sucesiva de nucleótidos mediante un grupo fosfato, como se muestra en la Figura 3.17. El grupo fosfato unido por un enlace fosfoéster al carbono 5′ de un nucleótido, se une por un segundo enlace fosfoéster al carbono 3′ del siguiente nucleótido. En esencia, es una reacción de condensación, con los grupos —H y —OH provenientes, respectivamente, del azúcar y del fosfato. La unión resultante se denomina **enlace 3′,5′ fosfodiéster**. El **polinucleótido** formado en este proceso tiene una direccionalidad intrínseca, con un grupo hidroxilo 5′ en un extremo y otro hidroxilo 3′ en el otro extremo. Por convención, las secuencias nucleotídicas se escriben siempre desde el extremo 5′ al extremo 3′ del polinucleótido.

La síntesis de los ácidos nucleicos, al igual que la de las proteínas, requiere energía e información. Para proveer de

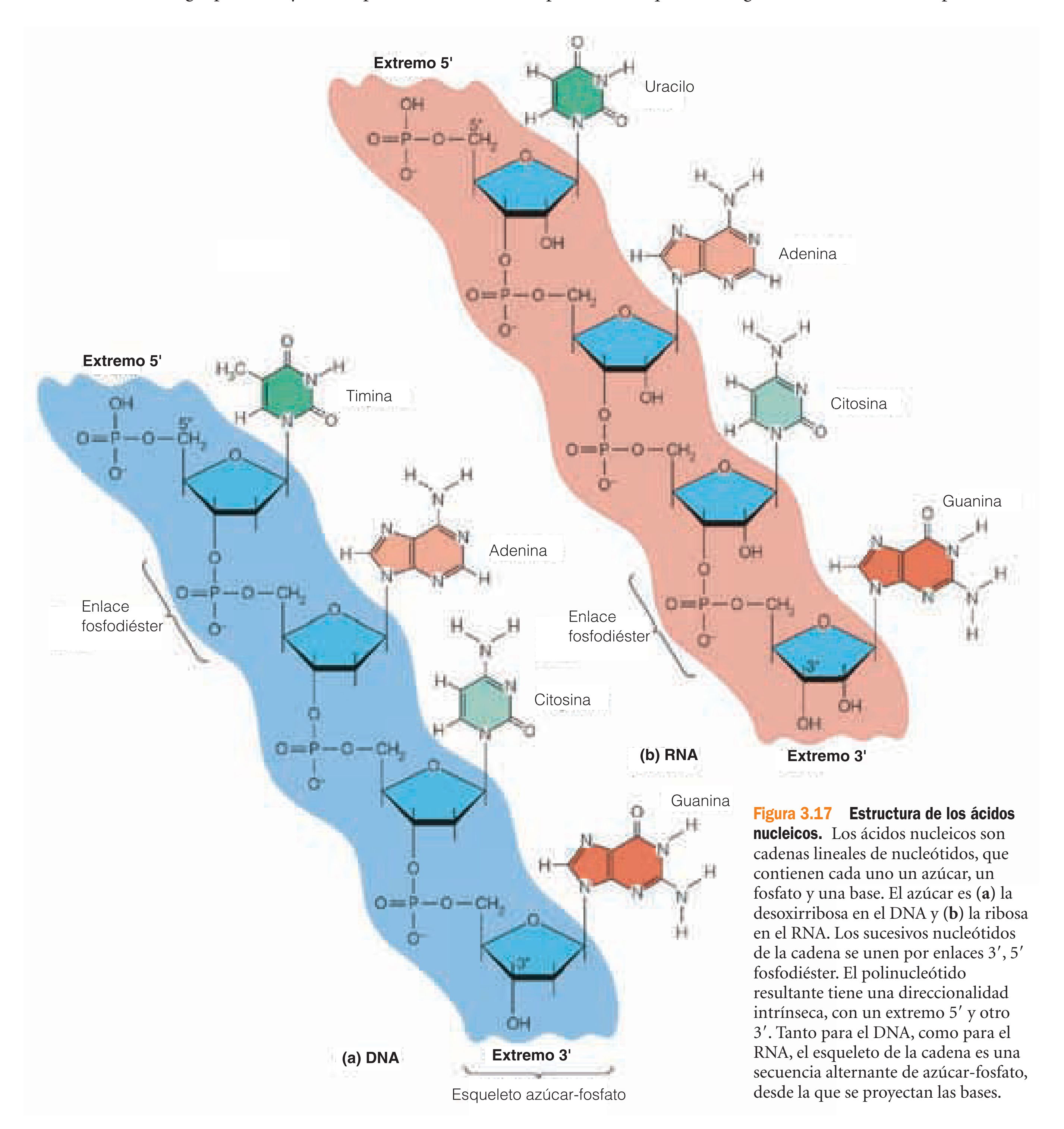


Figura 3.17 Estructura de los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos son cadenas lineales de nucleótidos, que contienen cada uno un azúcar, un fosfato y una base. El azúcar es (**a**) la desoxirribosa en el DNA y (**b**) la ribosa en el RNA. Los sucesivos nucleótidos de la cadena se unen por enlaces 3′, 5′ fosfodiéster. El polinucleótido resultante tiene una direccionalidad intrínseca, con un extremo 5′ y otro 3′. Tanto para el DNA, como para el RNA, el esqueleto de la cadena es una secuencia alternante de azúcar-fosfato, desde la que se proyectan las bases.

la energía necesaria para formar cada nuevo enlace fosfodiéster, los sucesivos nucleótidos entran en la forma energética de nucleósidos trifosfato. Los precursores para la síntesis del DNA son, por tanto, dATP, dCTP, dGTP y dTTP. Para la síntesis del RNA son necesarios ATP, CTP, GTP y UTP.

Se requiere información para la síntesis de ácidos nucleicos, pues los nucleótidos que van incorporándose, deben ser añadidos en una secuencia específica, determinada genéticamente. Para este propósito, se emplean moléculas preexistentes como **moldes** para especificar el orden de los nucleótidos. Tanto para la síntesis del DNA, como del RNA, el molde suele ser DNA. La síntesis de nucleótidos dirigida por un molde se fundamenta en que cada nucleótido entrante se selecciona porque su base puede ser reconocida por, e interaccionará con, la base del nucleótido presente en esa posición en el molde.

Este proceso de reconocimiento depende de una importante propiedad química de las bases púricas y pirimidínicas, mostrada en la Figura 3.18. Estas bases tienen grupos carbonilo y átomos de nitrógeno capaces de formar puentes de hidrógeno bajo condiciones apropiadas. Las relaciones de complementariedad entre purinas y pirimidinas permiten a A formar dos puentes de hidrógeno con T (o U) y a G formar tres puentes de hidrógeno con C, como se observa en la Figura 3.18. El emparejamiento

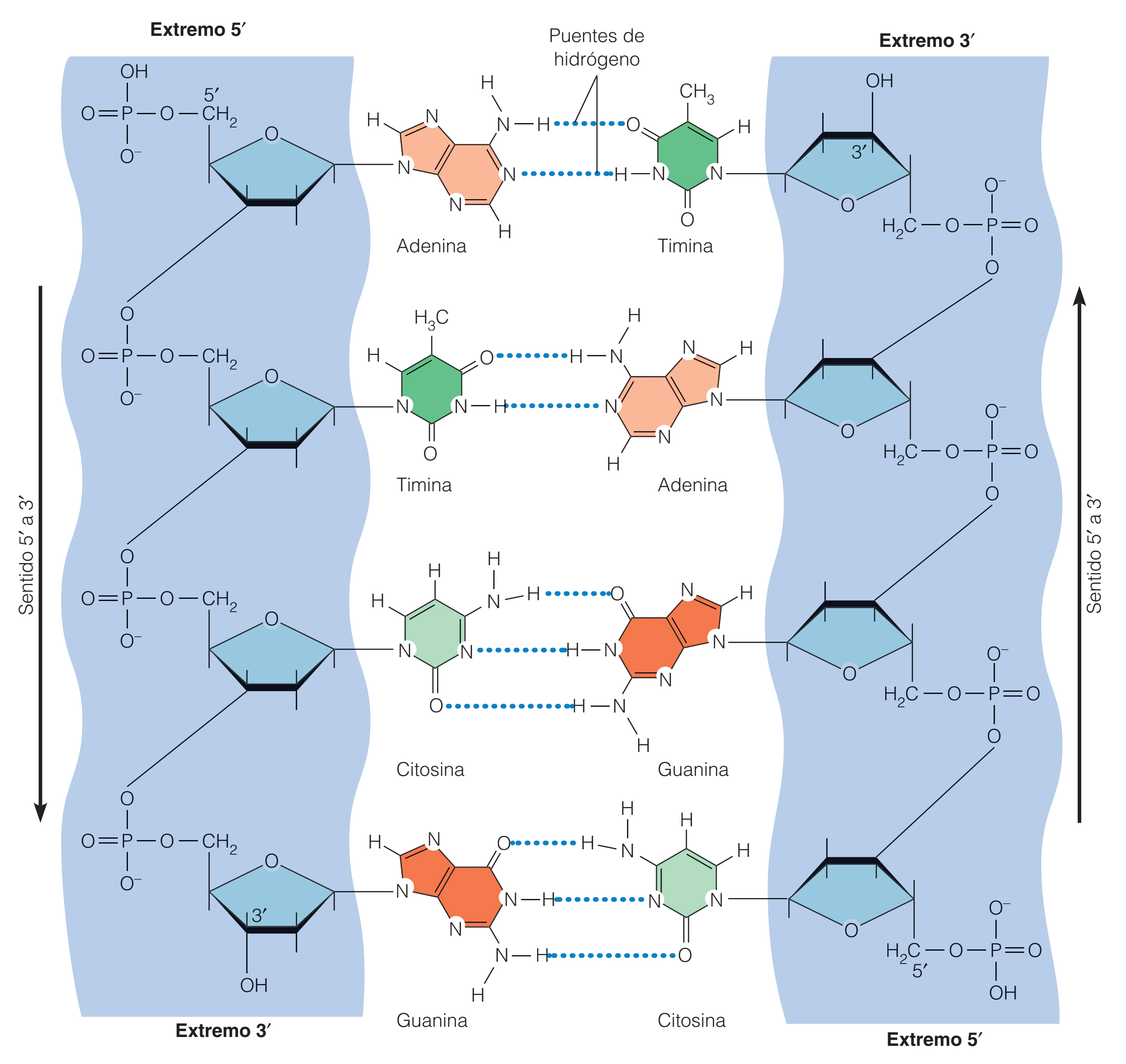


Figura 3.18 Puentes de hidrógeno en la estructura de los ácidos nucleicos. Los puentes de hidrógeno (puntos azules) entre la adenina y la timina y entre la citosina y la guanina, son los responsables del apareamiento de bases AT y GC del DNA. Obsérvese que el par AT se mantiene por dos puentes de hidrógeno, mientras que el par GC tiene tres puentes. Si una de las dos hebras fuese de RNA, el correspondiente par para la adenina sería el uracilo (U).

En busca de la doble hélice

«Nunca he visto a Francis Crick comportarse con modestia. Quizá lo haga en compañía de otros, pero yo no he visto ningún motivo para creerlo así.» Con esta observación poco reverente como introducción, James Watson describe, de una forma muy personal y entretenida, los sucesos que condujeron al descubrimiento de la estructura del DNA. Este relato, publicado en 1968 bajo el título *La doble hélice*, es una lectura sin maquillar y fascinante sobre los entresijos de cómo se produjo un inmenso descubrimiento científico. Comentando las razones por las que escribió el libro, Watson señala en el prefacio que «existe una ignorancia general sobre la forma en la que se hace la "ciencia". No quiere esto decir que toda la ciencia se hace de la manera descrita aquí. Ni mucho menos, puesto que las formas de investigación científica son tan variadas como las personalidades humanas. Por otra parte, no creo que la forma en la que se descubrió el DNA, constituya una excepción dentro de un mundo científico complicado por los empujes contradictorios de la ambición y el juego limpio».

Como retrata Watson en su relato, Watson y Crick eran tan distintos uno del otro como es posible. Pero tenían un punto en común y éste era la capacidad de «hacer» ciencia de una forma no convencional, aunque sí productiva. Hicieron poca experimentación real con el DNA; prefirieron analizar en profundidad los logros de otros investigadores, poniendo a trabajar a su considerable ingenio para desarrollar modelos, ejercitando su astucia e intuición (Figura 3A.1). Como consecuencia de todo ello, emergió en un espacio de tiempo relativamente breve, la comprensión de la estructura de la doble hélice del DNA, que ha sido uno de los mayores logros científicos del siglo XX.

Para apreciar mejor su brillantez y sus descubrimientos, debemos entender primero el entorno en el cual trabajaban Watson y Crick. El principio de los años 50 fue un periodo excitante en biología. Habían pasado sólo unos pocos años desde que Avery, MacLeod y McCarty publicaran la evidencia de la transformación genética en bacterias, pero el trabajo de Hershey y Chase, que confirmaba que el DNA era el material genético, aún no había aparecido impreso. Entre tanto, en la Universidad de Columbia, los análisis químicos que había llevado a cabo Erwin Chargaff demostrando que, aunque las proporciones relativas de las cuatro bases —A, T, C y G— variaban considerablemente de una especie a otra, eran siempre las mismas para todos los miembros de una determinada especie. El segundo hallazgo de Chargaff fue aún más sorprendente y portentoso: para una especie dada, A y T siempre aparecían en la misma proporción y lo mismo ocurría con G y C (es decir, A = T y G = C).

Pero las pistas más importantes vinieron del trabajo de Maurice Wilkins y Rosalind Franklin del King's College de Londres. Wilkins y Franklin usaron la técnica de difracción de rayos X para estudiar la estructura del DNA, despreciando en cierta medida la estrategia de diseñar modelos de Watson y Crick. La difracción de rayos X es una herramienta útil para detectar la presencia regular de elementos estructurales en una sustancia cristalina, puesto que cualquier característica que se repita a intervalos regulares en un cristal, produce un patrón de difracción característico. El análisis impecable del patrón de difracción del DNA obtenido por Franklin, permitió descubrir que la molécula era larga y estrecha, con elementos estructurales que se repetían cada 0,34 nm. Más aún, la molécula parecía tener características de hélice.

Esto animó la imaginación de Watson y Crick, que acababan de tener noticia de los progresos de Pauling y Corey sobre la estructura en hélice α de las proteínas. Trabajando con modelos de cartulina de las bases, Watson y Crick llegaron a la idea feliz de que el DNA era también una hélice, pero con una diferencia importante: era una *doble* hélice, con puentes de hidrógeno entre purinas y pirimidinas. El descubrimiento queda mejor relatado en palabras del propio Watson:

> *Cuando llegué la mañana siguiente a nuestro despacho, aún vacío, despejé rápidamente de papeles mi escritorio, de forma que pudiera disponer de una superficie grande y plana en la cual disponer pares de bases interaccionando por puentes de hidrógeno. Aunque seguí aferrado a mi prejuicio inicial de emparejar bases semejantes, pronto me di cuenta de que aquello no conducía a ningún lado. Cuando Jerry [Donohue, un cristalógrafo americano que trabajaba en el mismo laboratorio] entró, levanté la vista, vi que no era Francis y comencé a mover las bases, probando otras posibilidades de emparejamiento. De repente, caí en la cuenta de que un par adenina-timina, estabilizado por dos puentes de hidrógeno, tenía el mismo perfil que un par guanina-citosina mantenido por, al menos, dos puentes de hidrógeno. Todos los puentes de hidrógeno parecían formarse de manera natural; no había que recurrir a ningún artificio para que los dos tipos de pares de bases tuvieran idéntica forma. Inmediatamente llamé a Jerry para preguntarle si esta vez tenía alguna objeción que hacer a mis nuevos pares de bases.*

de A con T (o U) y de G con C es una propiedad fundamental de los ácidos nucleicos. Genéticamente, este **apareamiento de bases** permite el reconocimiento de los ácidos nucleicos entre sí, como se verá en el Capítulo 18. Por ahora nos concentraremos en las implicaciones estructurales.

El DNA es una hélice de doble cadena

Uno de los avances biológicos más significativos del siglo XX se publicó en la revista *Nature*, en 1953, en un artículo de dos páginas. En dicho artículo, Francis Crick y James Watson propusieron que el DNA estaba formado por una

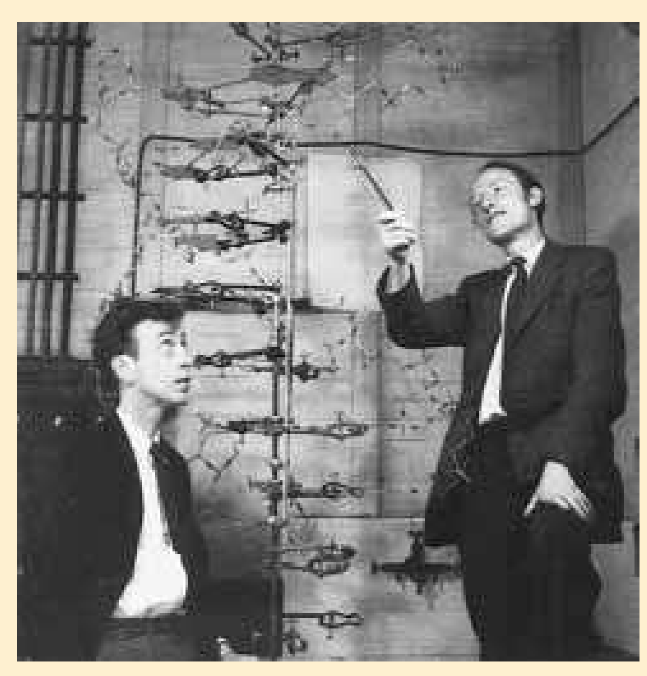


Figura 3A.1 James Watson (izquierda) y Francis Crick (derecha) trabajando con su modelo del DNA.

Cuando dijo que no, mi moral subió por las nubes, pues sospechaba que ahora teníamos la respuesta al enigma del porqué el número de residuos de purina igualaba al número de residuos de pirimidina. Dos secuencias irregulares de bases podrían ser empaquetadas en el centro de una hélice, siempre que una purina se uniera por puentes de hidrógeno a una pirimidina. Más aún, la dependencia de los puentes de hidrógeno significaba que la adenina tendría que aparearse con la timidina y la guanina con la citosina. De pronto, las reglas de Chargaff surgían como consecuencia de la estructura en doble hélice del DNA. Y, lo que era aún más excitante, este tipo de doble hélice sugería un esquema de replicación más satisfactorio que el de mi intento de emparejar bases semejantes. Emparejar adenina con timina y guanina con citosina, significaba que las secuencias de bases de las dos cadenas entrelazadas, eran complementarias entre sí. Conocida la secuencia de bases de una cadena, la de su compañera quedaba determinada automáticamente. Así pues, desde el punto de vista conceptual era muy fácil comprender que una cadena pudiera servir de molde, para la síntesis de la cadena complementaria.

Cuando llegó Francis, antes incluso de que pudiera franquear la puerta, ya le estaba contando que teníamos la solución en nuestras manos. Aunque, por una simple cuestión de principios, mantuvo el escepticismo durante algunos momentos, la similitud en la forma de los pares AT y GC, produjo en él el impacto esperado. Su intento de acoplar las bases de otras formas alternativas, no condujo a resultados que satisficieran las reglas de Chargaff. Minutos después, apuntó la observación de que los dos enlaces glicosídicos (los que unen la base y el azúcar) de cada par de bases, estaban relacionados sistemáticamente por un eje dual, perpendicular al eje de la hélice. Así, ambos pares podrían ser dados la vuelta y, pese a todo, tendrían sus enlaces glicosídicos orientados en el mismo sentido. La consecuencia importante de esto es que cualquier cadena podría tener, tanto purinas, como pirimidinas. Al mismo tiempo se sugería, que las dos cadenas debían disponerse en sentidos opuestos.

La siguiente pregunta era ver si los pares AT y GC encajarían en la configuración de la cadena que había sido imaginada durante las dos semanas precedentes. A primera vista parecía que sí, puesto que yo había previsto un gran espacio vacío en el centro para las bases. Pese a todo, ambos sabíamos que no estaríamos satisfechos hasta completar un modelo en el que todas las relaciones estereoquímicas fueran satisfactorias. Por otra parte, las consecuencias del modelo eran tan importantes, que no queríamos arriesgarnos a cantar victoria. Así pues, me sentí un tanto indispuesto cuando, a la hora de comer, Francis irrumpió en el Eagle contando a quien pudiera oírle, que habíamos descubierto el secreto de la vida.*

El resto es ya historia. Poco después, la prestigiosa revista *Nature* lanzó un artículo poco pretencioso de dos páginas, sencillamente titulado «La Estructura Molecular de los Ácidos Nucleicos: la Estructura del Ácido Desoxirribonucleico», por James Watson y Francis Crick. Aunque breve en su longitud, el artículo ha tenido implicaciones decisivas, pues el modelo de doble cadena en el que trabajaron Watson y Crick durante 1953, ha sido confirmado como correcto en todos sus detalles esenciales, desencadenando una revolución en el campo de la biología.

* *Extraído de* The Double Helix, *pp. 194-197. Copyright © 1968 James D. Watson. Reproducido con permiso del autor y de Atheneum Publishers, Inc.*

hélice de doble cadena —la ahora famosa **doble hélice**— que no sólo satisfacía las propiedades físicas y químicas ya conocidas del DNA, sino que también sugería un mecanismo para la replicación de su estructura. Algunos de los puntos culminantes de este excitante capítulo de la historia de la biología contemporánea se relatan en el Anexo 3A.

Básicamente, la doble hélice consiste en dos cadenas complementarias de DNA enrolladas conjuntamente alrededor de un eje común, formando una hélice dextrógira que recuerda a una escalera circular (Figura 3.19). Las dos cadenas se orientan en sentidos opuestos a lo largo de la hélice, una discurriendo en sentido $5' \rightarrow 3'$ y la otra en

sentido 3′ ⟶ 5′. El esqueleto de cada cadena está formado por las moléculas de azúcar alternando con grupos fosfato. Los grupos fosfato están cargados y las moléculas de azúcar contienen grupos hidroxilo polares y, por tanto, no sorprende que el elemento azúcar-fosfato de cada cadena se sitúe hacia el exterior de la hélice del DNA, donde puede interaccionar favorablemente con el medio acuoso circundante. Las bases purínicas y pirimidínicas, por otra parte, son compuestos aromáticos con menor afinidad por el agua. De acuerdo con esto, se orientan hacia el interior, formando los pares de bases que mantienen unidas a las dos cadenas.

Para formar una doble hélice estable, las hebras deben discurrir, no sólo de forma *antiparalela* (en sentidos opuestos), sino también *complementaria*. Con esto queremos decir que una base en una hebra puede formar puentes de hidrógeno específicos con la base que se enfrenta a ella en la otra hebra. A partir de los posibles emparejamientos mostrados en la Figura 3.18, esto quiere decir que cada A se apareará con una T y que cada G se apareará con una C. En ambos casos uno de los miembros de la pareja es una pirimidina (T o C) y el otro es una purina (A o G). La distancia entre dos elementos azúcar-fosfato de la doble hélice es la suficiente para acomodar cada uno de los tipos de base. Si consideramos a los elementos azúcar-fosfato como las bandas laterales de una escalera circular, los peldaños serían los pares de bases mantenidos por puentes de hidrógeno (*véase* la Figura 3.19).

La hélice dextrógira de Watson-Crick mostrada en la Figura 3.19 es una versión ideal de lo que se denomina *B-DNA*. El B-DNA es la principal forma de DNA de las células, pero pueden existir otras dos formas, posiblemente como segmentos cortos intercalados con moléculas formadas principalmente por B-DNA. El *A-DNA* tiene una configuración de hélice dextrógira, más corta y gruesa que la del B-DNA. Por último, el *Z-DNA* es una doble hélice levógira, cuyo nombre deriva del patrón en zigzag de su más largo y delgado esqueleto de azúcar-fosfato. Para comparar las estructuras del B-DNA y el Z-DNA, *véase* la Figura 18.5.

La estructura del RNA también depende, en parte, del apareamiento de bases, pero en este caso se establece, en general, entre regiones complementarias dentro de una misma hebra. El apareamiento es mucho menos extenso que el que se produce entre las hebras del DNA. Las estructuras secundaria y terciaria del RNA sólo son bien conocidas en el caso del tRNA, como veremos en el Capítulo 21. (Para detalles de la complementariedad y apareamiento de bases en las moléculas del tRNA, *véase* la Figura 21.17).

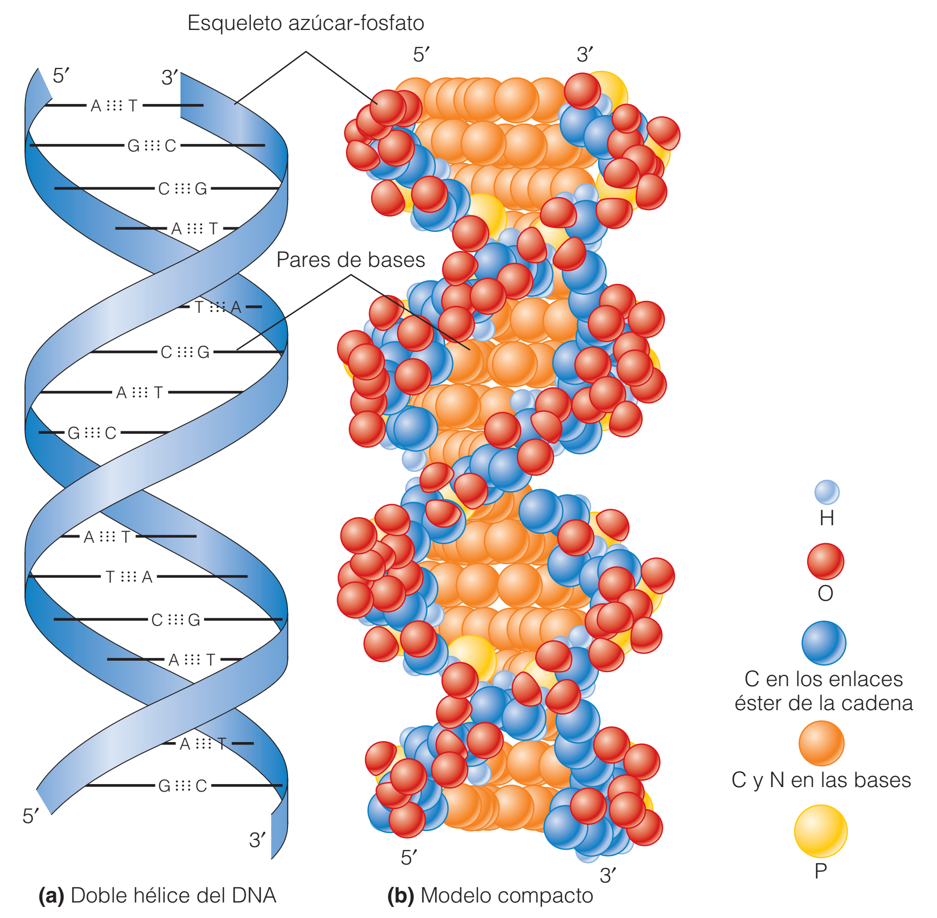


Figura 3.19 Estructura de la doble hélice del DNA. (**a**) Representación esquemática de la estructura en doble hélice del DNA. La banda retorcida representa al esqueleto de azúcar-fosfato de la molécula, mientras que las barras horizontales representan los pares de bases de las dos cadenas. (**b**) Modelo compacto de la doble hélice del DNA, con el código de colores de los átomos de H, O, C, N y P.

Polisacáridos

Las siguientes moléculas a considerar son los polisacáridos, que son polímeros largos de azúcares, modificados o no. En general, los polisacáridos están formados por un solo tipo de unidad repetitiva, o algunas veces, por la repetición de dos unidades. Son, por otra parte, moléculas que no portan información. (Sin embargo, como veremos en el Capítulo 7, algunos polímeros cortos llamados oligosacáridos, cuando se unen a proteínas de la superficie celular, desempeñan un importante papel en el reconocimiento de otras células y de moléculas de señalización.) Como se indicó anteriormente, los polisacáridos más abundantes en los organismos superiores son los de reserva, el almidón y el glucógeno, y el polisacárido estructural celulosa. Cada uno de sus polímeros está formado por el azúcar de seis carbonos glucosa, si bien difieren por la naturaleza de los enlaces entre las sucesivas unidades de glucosa y por la presencia y longitud de ramas laterales.

Los monómeros son los monosacáridos

Las unidades repetitivas de los polisacáridos son azúcares sencillos denominados monosacáridos (del griego *mono*, que significa «único» y *sakcharon* que significa «azúcar»). Un azúcar puede definirse como un aldehído o una cetona que tiene más de dos grupos hidroxilo. Existen, pues, dos tipos de azúcares: los *aldoazúcares*, con un grupo carbonilo terminal (Figura 3.20a) y los *cetoazúcares*, con un grupo carbonilo intermedio (Figura 3.20b). Dentro de cada categoría, los azúcares reciben nombres genéricos de acuerdo al número de átomos de carbono que contienen. La mayoría de los azúcares tienen entre tres y siete átomos de carbono y son clasificados, por tanto, como triosas (tres átomos), tetrosas (cuatro carbonos), pentosas (cinco carbonos), hexosas (seis carbonos) o heptosas (siete carbonos). Acabamos de encontrarnos con dos pentosas —la ribosa del RNA y la desoxirribosa del DNA.

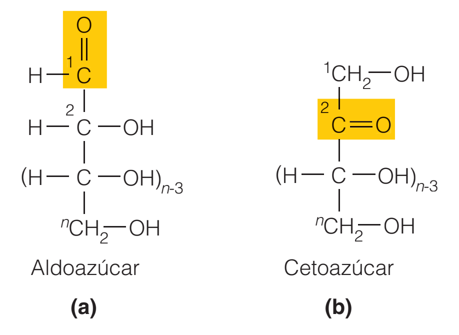


Figura 3.20 Estructura de los monosacáridos. (**a**) Los aldoazúcares tienen un grupo carbonilo en el átomo de carbono 1. (**b**) Los cetoazúcares tienen grupo carbonilo en el átomo de carbono 2. El número de átomos de carbono (*n*) de un monosacárido varía entre 3 y 7.

El monosacárido más habitual en el mundo biológico es la aldohexosa D-glucosa, representada por la fórmula $C_6H_{12}O_6$ y por la estructura mostrada en la Figura 3.21. La fórmula $C_nH_{2n}O_n$ es característica de los azúcares y en ella se fundamenta el término **carbohidrato**, pues en principio se pensó que este tipo de compuestos eran «hidratos de carbono» —$C_n(H_2O)_n$. El término persiste, pero de ninguna manera debe pensarse que un hidrato de carbono está formado por átomos de carbono hidratados.

Manteniendo la regla general de numeración de los carbonos de una molécula orgánica, el carbono 1 es el más oxidado, es decir, el del grupo carbonilo. Nótese que la glucosa tiene cuatro carbonos asimétricos (los átomos 2, 3, 4 y 5). Hay, por tanto, $2^4 = 16$ posibles diferentes estereoisómeros del aldoazúcar $C_6H_{12}O_6$, pero sólo nos ocuparemos de la glucosa, que es el isómero más estable de los 16.

La Figura 3.21a muestra a la D-glucosa en la forma que los químicos denominan **proyección de Fischer**, con los grupos —H y —OH proyectándose ligeramente fuera el plano del papel. Esta estructura presenta a la glucosa como una molécula lineal, y es a menudo útil para la representación de la misma, con fines pedagógicos. Sin embargo, la realidad es que la glucosa existe en la célula en un equilibrio dinámico entre la configuración lineal (de cadena abierta) de la Figura 3.21a y la forma de anillo de la Figura 3.21b. La forma anular es la predominante porque es la más estable desde el punto de vista energético y, por tanto, la más favorecida. Dicha forma de anillo es el resultado de la adición del grupo hidroxilo del átomo de carbono 5 al carbono 1. Aunque la yuxtaposición de los átomos de carbono 1 y 5, requerida para la formación del anillo, parece muy improbable en la proyección de Fischer, realmente está favorecida por la naturaleza tetraédrica de cada átomo de carbono.

Una representación más satisfactoria de la molécula de glucosa es la que se observa en la Figura 3.21c. La ventaja de la **proyección de Haworth** es que, al menos, sugiere la relación espacial de las diferentes partes de la molécula y hace más fácilmente comprensible la formación espontánea de un enlace entre los carbonos 1 y 5. Cada una de las tres representaciones de la glucosa de la Figura 3.21 es válida, pero la proyección de Haworth es generalmente la preferida, porque muestra tanto el anillo, como las relaciones espaciales de los átomos de carbono.

Obsérvese que la formación de la estructura en anillo da lugar a la generación de una de las dos formas alternativas de la molécula, dependiendo de la orientación espacial del grupo hidroxilo en el átomo de carbono 1. Estas formas alternativas de la glucosa se denominan α y β. En la Figura 3.22 vemos que la α-D-glucosa tiene el grupo hidroxilo del carbono 1 apuntando hacia abajo, en la proyección de Haworth, mientras que en la β-D-glucosa, apunta hacia arriba. Tanto el almidón, como el glucógeno tienen a la α-D-glucosa como unidad repetitiva, mientras que la celulosa se forma por cadenas de β-D-glucosa.

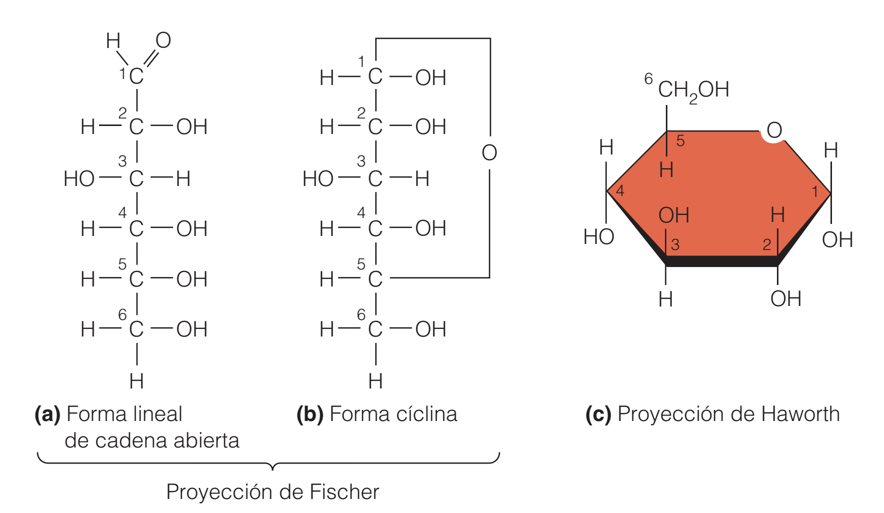


Figura 3.21 Estructura de la D-glucosa. La molécula de glucosa puede representarse según la proyección de Fischer, como (**a**) una cadena lineal, o (**b**) un anillo, o bien (**c**) según la proyección de Haworth en forma de anillo. En las representaciones de Fischer, se intenta proyectar ligeramente fuera del plano del papel a los grupos —H y —OH. En la proyección de Haworth, se pretende asimismo que los átomos de carbono 2 y 3 queden por delante del plano del papel y los átomos de carbono 5 y 6 aparezcan por detrás. Los grupos —H y —OH se proyectan hacia arriba y hacia abajo, como se indica. Obsérvese que los átomos de carbono se numeran con relación al extremo más oxidado de la molécula.

Además de aparecer libre y formando largas cadenas de polisacáridos, la glucosa forma **disacáridos**, constituidos por dos monosacáridos unidos entre sí covalentemente. En la Figura 3.23 se muestran tres disacáridos frecuentes. La *maltosa* (azúcar de malta) está formada por dos moléculas de glucosa, mientras que la *lactosa* (azúcar de la leche) contiene una glucosa unida a una galactosa. Por último, la *sacarosa* (el azúcar de mesa) tiene una glucosa unida a una fructosa. En el Capítulo 9 se analizarán detalladamente la galactosa y la fructosa, con motivo del estudio de la química y metabolismo de varios azúcares.

Todos estos disacáridos se forman en una reacción de condensación en la cual los monosacáridos se unen, perdiendo una molécula de agua. El **enlace glicosídico** resultante es el característico entre azúcares. En el caso de la maltosa, las dos moléculas de glucosa que la constituyen están en la forma α y el enlace glicosídico se forma entre el carbono 1 de una glucosa y el carbono 4 de la otra. Este enlace se llama α *glicosídico*, porque involucra al carbono uno con su grupo hidroxilo en configuración α. La lactosa, por otra parte, se caracteriza por un enlace β *glicosídico*, pues el grupo hidroxilo del carbono 1 de la galactosa está en configuración β. La distinción entre los enlaces α y β es crítica cuando se consideran los polisacáridos, pues, tanto la configuración tridimensional, como la función biológica del polímero, dependen del tipo de enlace entre las unidades que se repiten.

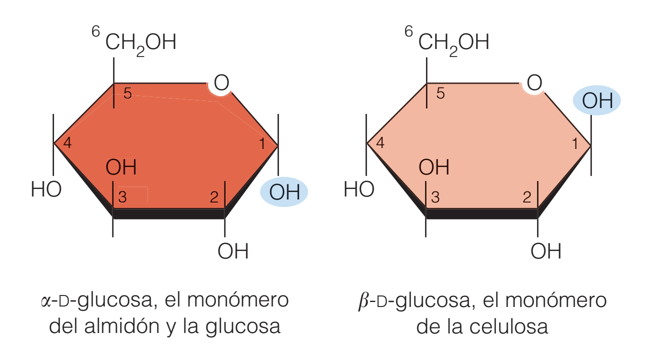


Figura 3.22 Representación en anillo de la D-glucosa. El grupo hidroxilo del átomo de carbono 1 apunta hacia abajo en la forma α y hacia arriba en la forma β.

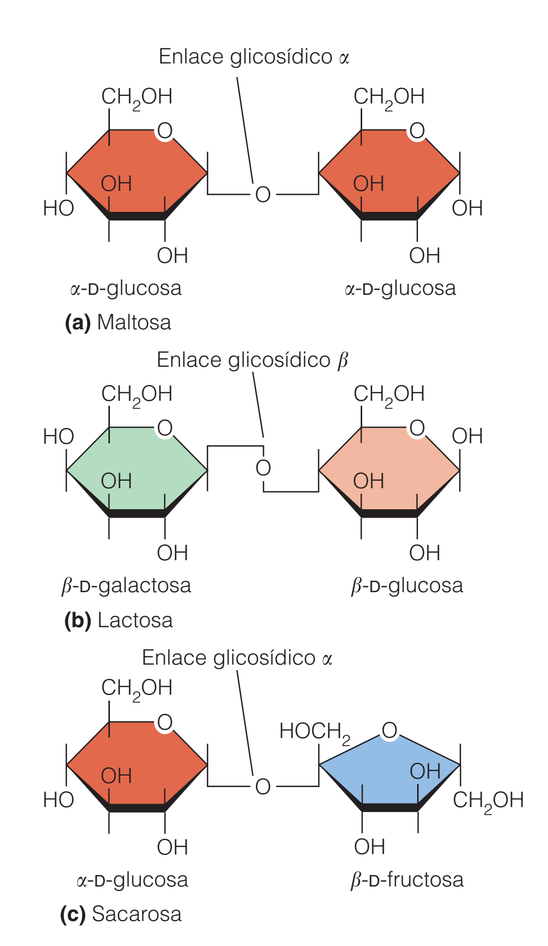


Figura 3.23 Disacáridos comunes. (**a**) La maltosa (azúcar de malta) está formada por dos moléculas de α-D-glucosa unidas por un enlace α glicosídico. (**b**) La lactosa (azúcar de la leche) consta de una molécula de β-D-galactosa unida a una molécula de β-D-glucosa por un enlace β glicosídico. (**c**) En la sacarosa (azúcar de mesa), se unen, por un enlace α glicosídico, una molécula de α-D-glucosa y una molécula de β-D-fructosa.

Los polisacáridos de reserva y estructurales son los polímeros

Los polisacáridos cubren funciones de almacenamiento y estructurales en la célula. Los principales polisacáridos de almacenamiento son el **almidón** de las células vegetales (Figura 3.24a) y el **glucógeno** de las células animales (Figura 3.24b). Ambos están formados por unidades de α-D-glucosa unidas por enlaces α glicosídicos. Además de los enlaces α(1 ⟶ 4) que unen los átomos de carbono 1 y 4 de

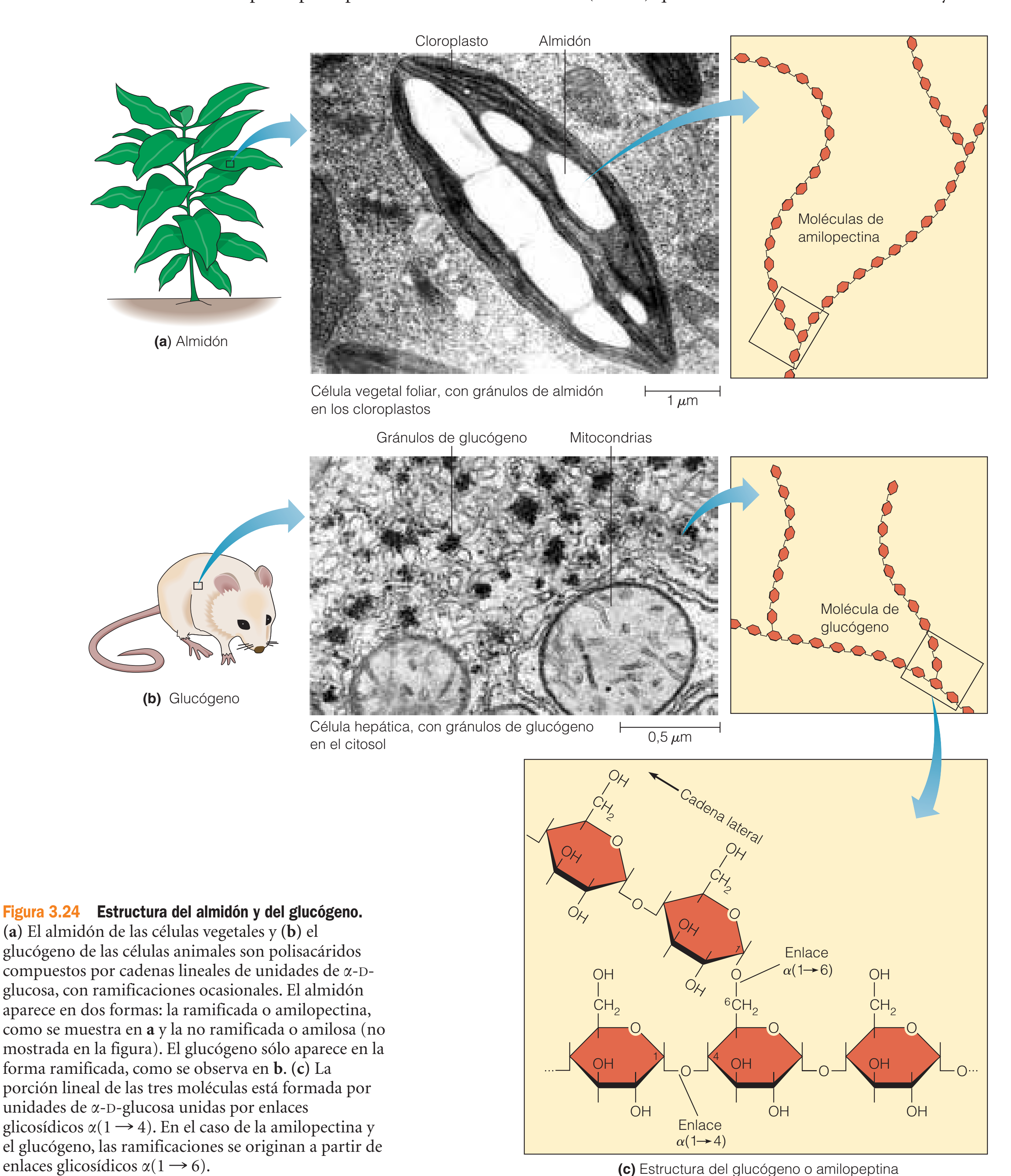


Figura 3.24 Estructura del almidón y del glucógeno. (**a**) El almidón de las células vegetales y (**b**) el glucógeno de las células animales son polisacáridos compuestos por cadenas lineales de unidades de α-D-glucosa, con ramificaciones ocasionales. El almidón aparece en dos formas: la ramificada o amilopectina, como se muestra en **a** y la no ramificada o amilosa (no mostrada en la figura). El glucógeno sólo aparece en la forma ramificada, como se observa en **b**. (**c**) La porción lineal de las tres moléculas está formada por unidades de α-D-glucosa unidas por enlaces glicosídicos α(1 ⟶ 4). En el caso de la amilopectina y el glucógeno, las ramificaciones se originan a partir de enlaces glicosídicos α(1 ⟶ 6).

las glucosas adyacentes, estos polisacáridos pueden presentar en ocasiones enlaces $\alpha(1 \rightarrow 6)$, que dan lugar a cadenas laterales (Figura 3.24c). Así, los polisacáridos de almacenamiento pueden ser polímeros ramificados o no, dependiendo de la presencia o ausencia de enlaces $\alpha(1 \rightarrow 6)$.

El glucógeno está altamente ramificado, con enlaces $\alpha(1 \rightarrow 6)$ cada 8 a 10 unidades de glucosa, que dan lugar a cadenas cortas de unas 8 a 12 unidades de glucosa (Figura 3.24b). El glucógeno se almacena sobre todo en el hígado y en el músculo. En el hígado se usa como fuente de glucosa para mantener los niveles de azúcar en sangre; en el músculo sirve como combustible para generar el ATP necesario en la contracción muscular.

El almidón puede aparecer como **amilosa**, no ramificada, o **amilopectina**, ramificada. Al igual que el glucógeno, la amilopectina tiene enlaces $\alpha(1 \rightarrow 6)$, si bien su frecuencia es menor (uno cada 12 a 15 unidades de glucosa),mientras que las cadenas laterales son mucho más largas (de 20 a 25 unidades de glucosa; *véase* la Figura 3.24a). Los depósitos de almidón están formados, habitualmente, por un 10-30% de amilosa y un 70-90% de amilopectina. El almidón es almacenado en las plantas en forma de *gránulos de almidón* en el interior de los plastidios, sean los *cloroplastos* de los tejidos fotosintéticos, en los que se fija el carbono y se sintetizan los azúcares, sean los amiloplastos, que son los plastidios especializados en el almacenamiento de almidón. El tubérculo de la patata, por ejemplo, está lleno de estos amiloplastos.

El ejemplo mejor conocido de polisacárido estructural es la celulosa, presente en la pared de las células vegetales (Figura 3.25). Cuantitativamente, la celulosa es un polímero importante; ¡más de la mitad del carbono de las plantas superiores está presente en forma de celulosa! Como el almidón y el glucógeno, la celulosa es también un polímero de glucosa, pero el monómero que se repite es la β-D-glucosa y el enlace es, por tanto, $\beta(1 \rightarrow 4)$. Este enlace tiene consecuencias estructurales que veremos seguidamente, además de implicaciones nutricionales. Los mamíferos no poseen una enzima que pueda hidrolizar el enlace $\beta(1 \rightarrow 4)$; por tanto, no puede utilizar la celulosa como alimento. En suma, podemos digerir las patatas (almidón) pero no la hierba (celulosa). Los animales como las vacas y las ovejas parecen ser una excepción, puesto que ellas sí comen hierba y productos vegetales similares. Pero realmente tampoco pueden romper el enlace β glicosídico; dependen de una población de baterías y protozoos residentes en el rumen (una de las partes del estómago), que hacen el trabajo por ellas. Los microorganismos digieren la celulosa y los huéspedes obtienen los productos finales de la digestión microbiana, en una forma que ahora sí pueden asimilar.

Aunque la celulosa con uniones $\beta(1 \rightarrow 4)$ es el polisacárido estructural más abundante, no es el único. Las celulosas de las paredes celulares de los hongos presentan uniones $\beta(1 \rightarrow 4)$ o $\beta(1 \rightarrow 3)$, dependiendo de las especies. Las paredes bacterianas son algo más complejas,

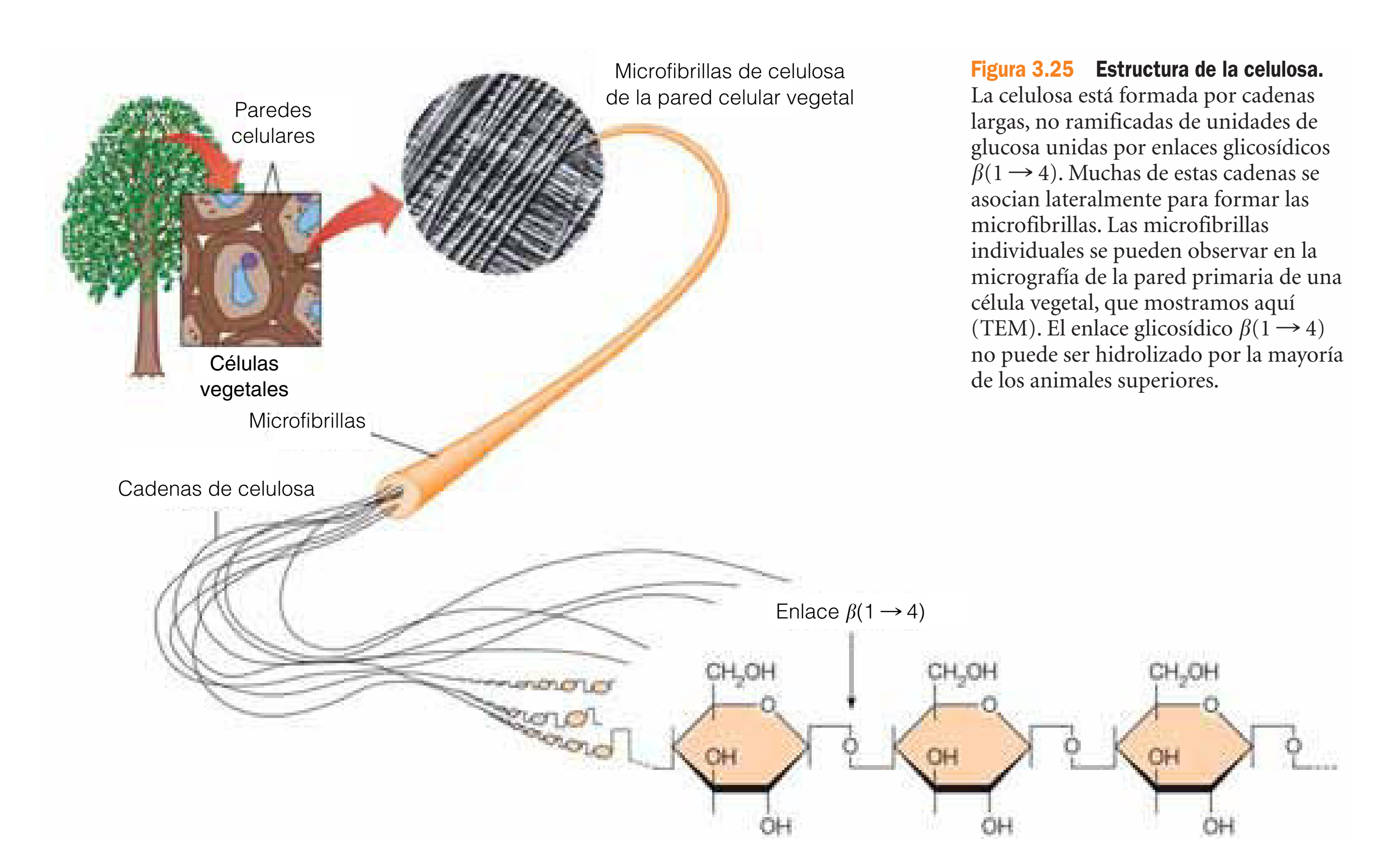
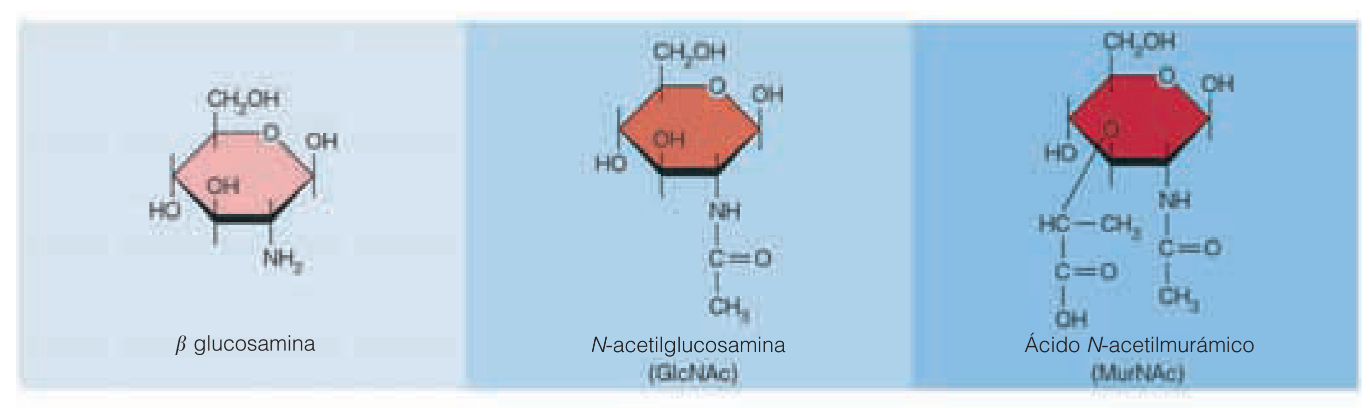
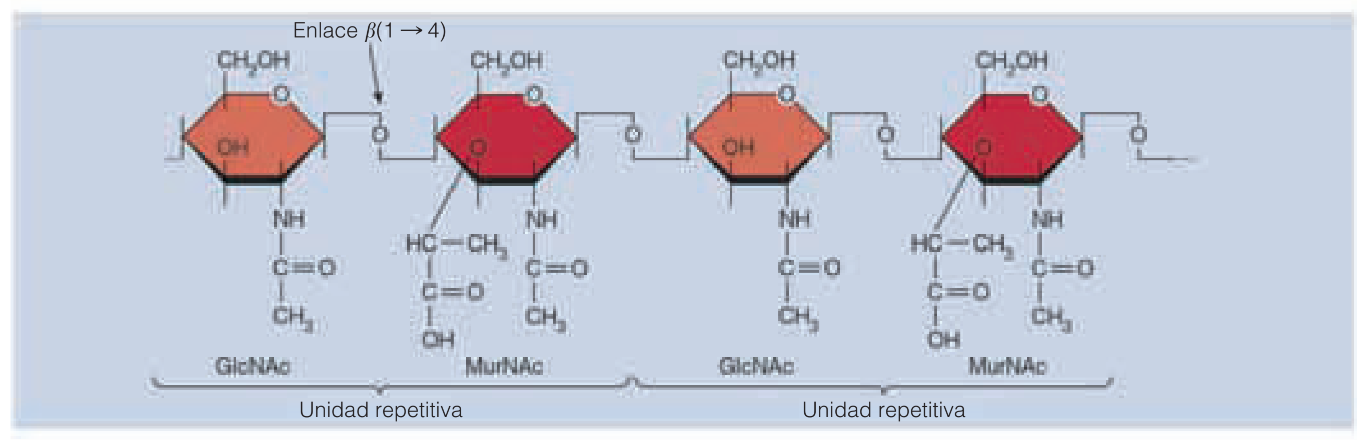


Figura 3.25 Estructura de la celulosa. La celulosa está formada por cadenas largas, no ramificadas de unidades de glucosa unidas por enlaces glicosídicos $\beta(1 \rightarrow 4)$. Muchas de estas cadenas se asocian lateralmente para formar las microfibrillas. Las microfibrillas individuales se pueden observar en la micrografía de la pared primaria de una célula vegetal, que mostramos aquí (TEM). El enlace glicosídico $\beta(1 \rightarrow 4)$ no puede ser hidrolizado por la mayoría de los animales superiores.

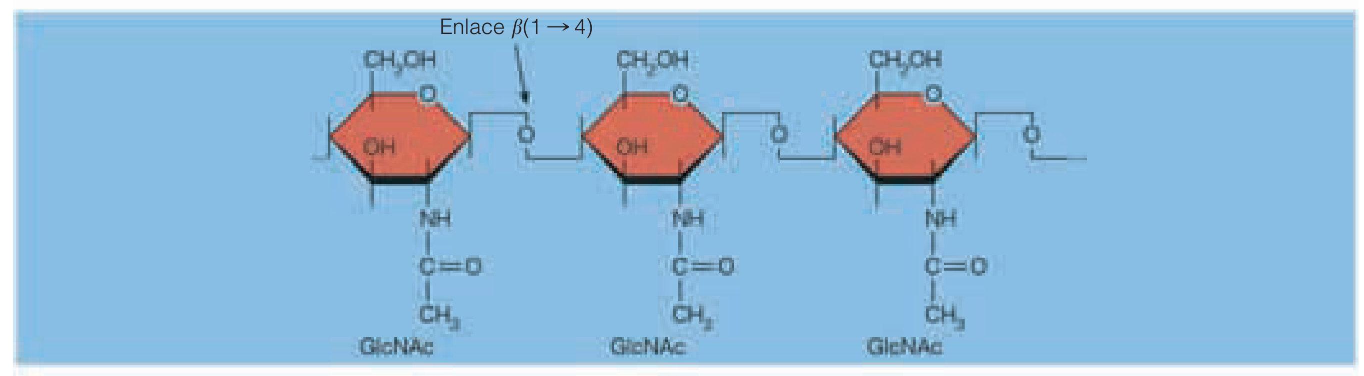
conteniendo dos nuevos tipos de azúcares, la *N-acetilglucosamina* (*GlcNAc*) y el *ácido N-acetilmurámico* (*MurNAc*). En la Figura 3.26a puede verse que GlcNAc y MurNAc son derivados de la *β-glucosamina*, una molécula de glucosa en la que el grupo hidroxilo del carbono 2 está reemplazado por un grupo amino. GlcNAc se forma por acetilación del grupo amino y MurNAc requiere la adición ulterior del grupo lactilo, de tres átomos de carbono, en el carbono 3. Los polisacáridos de la pared se forman por uniones $\beta(1 \rightarrow 4)$, en una secuencia estrictamente alternativa de GlcNAc y MurNAc (Figura 3.26b). La Figura 3.26c muestra la estructura de otro polisacárido más, la **quitina**, propia del exoesqueleto de los insectos y del caparazón de los crustáceos. La quitina está formada exclusivamente por unidades de GlcNAc unidas por enlaces $\beta(1 \rightarrow 4)$.



(a) Unidades de los polisacáridos



(b) Polisacárido de la pared bacteriana



(c) Polisacárido quitina

Figura 3.26 Polisacáridos de las paredes celulares de bacterias y del exoesqueleto de los insectos. (**a**) Subunidades de glucosamina, *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido *N*-acetilmurámico (MurNAc). (**b**) Polisacárido de la pared bacteriana formado por unidades alternantes de GlcNAc y MurNAc unidas por enlaces $\beta(1 \rightarrow 4)$. (**c**) El polisacárido quitina, propio del exoesqueleto de insectos y del caparazón de los crustáceos, tiene a la GlcNAc como unidad repetitiva, que se va enlazando gracias a uniones $\beta(1 \rightarrow 4)$.

La estructura de los polisacáridos depende de la naturaleza de los enlaces glicosídicos implicados

La distinción entre los enlaces glicosídicos α y β de los polisacáridos de reserva y estructurales, tiene un significado que no es simplemente el nutritivo. Dadas las diferencias en los enlaces y, por ende, en las relaciones espaciales entre las sucesivas unidades de glucosa, los dos tipos de polisacáridos difieren significativamente en la estructura secundaria. La forma helicoidal, característica de proteínas y ácidos nucleicos, aparece también en los polisacáridos. Tanto el almidón, como el glucógeno, se enrollan espontáneamente formando hélices poco compactas, a menudo de estructura no muy ordenada, debido a las numerosas cadenas laterales de las amilopectinas y del glucógeno.

Por contra, la celulosa forma estructuras lineales rígidas. Éstas, a su vez, se agregan lateralmente formando microfibrillas (*véase* la Figura 3.25). Las microfibrillas tienen un diámetro de unos 25 nm y están formadas por unas 2.000 cadenas de celulosa. Las paredes de las plantas y de los hongos están formadas por esas microfibrillas rígidas de celulosa, embebidas en una *matriz no celulósica*, constituida por una mezcla variable de otros polímeros (principalmente, hemicelulosas y pectinas) y una proteína denominada *extensina*. Las paredes vegetales han sido comparadas apropiadamente al hormigón armado, en el cual las varillas de acero son repartidas en el cemento antes de que éste fragüe. En las paredes celulares, las microfibrillas son los «redondos» y la matriz no celulósica, el «cemento».

Lípidos

En sentido estricto, los **lípidos** no deberían estar incluidos en este capítulo, pues no son polímeros que precisan de la polimerización paso a paso, propia de las proteínas, los ácidos nucleicos, y los polisacáridos. Sin embargo, habitualmente son considerados como macromoléculas, debido a su peso molecular. Por otra parte, cualquier consideración de la estructura y la química de los componentes celulares, sería incompleta sin la referencia a este importante grupo de moléculas. Su inclusión aquí parece razonable a la luz de su frecuente asociación con las macromoléculas consideradas anteriormente, particularmente las proteínas.

Los lípidos constituyen una categoría heterogénea de componentes celulares, que se parecen entre sí más por sus propiedades de solubilidad, que por su estructura química. El rasgo distintivo de los lípidos es su naturaleza hidrófoba. Tienen poca, si alguna, afinidad por agua, pero se disuelven fácilmente en disolventes no polares, tales como el cloroformo o el éter. En consonancia, podemos esperar que sean ricos en regiones hidrocarbonadas no polares, y que tengan pocos grupos polares. Algunos lípidos, sin embargo, son *anfipáticos*, es decir, que tienen una región polar y otra apolar. Como ya se ha visto, esta característica es relevante en la estructura de las membranas.

Puesto que son definidos en términos de solubilidad más que por su estructura química, no debe sorprendernos encontrar en el grupo de los lípidos a moléculas funcional y químicamente diversas. Funcionalmente, los lípidos desempeñan tres papeles principales en las células. Algunos sirven como *reserva energética*, otros están implicados en la *estructura de membranas* y por último, otros tienen *funciones biológicas específicas*, como la transmisión de señales químicas en el interior y en el entorno célular. En términos de estructura química, podemos distinguir seis tipos principales de lípidos, que son los *ácidos grasos*, los *triacilgliceroles*, los *fosfolípidos*, los *glicolípidos*, los *esteroides* y los *terpenos*. Todos ellos se muestran en la Figura 3.27, que incluye ejemplos representativos de cada tipo. Daremos un repaso breve a cada una de estas categorías de lípidos, señalando sus funciones.

Los ácidos grasos son los ladrillos de varios tipos de lípidos

Iniciaremos nuestra descripción con los **ácidos grasos**, pues son los componentes de varios tipos de lípidos. Un ácido graso está formado por una larga cadena hidrocarbonada, no ramificada y con un grupo carboxilo en un extremo (Figura 3.27a). La molécula del ácido graso es anfipática; el grupo carboxilo confiere naturaleza polar a uno de los extremos (a menudo denominado «cabeza»), mientras que la «cola» hidrocarbonada es apolar. Los ácidos grasos contienen un número variable, pero generalmente par, de átomos de carbono. Lo normal es que oscilen entre 12 y 20 átomos de carbono, siendo especialmente frecuentes los de 16 y 18 átomos.

Los ácidos grasos están altamente reducidos, por lo que son capaces de rendir mucha energía tras la oxidación, siendo, por tanto, una forma muy eficaz de almacenamiento energético. En el Capítulo 10 veremos lo ventajoso que resulta almacenar energía en forma de grasa, en comparación con los hidratos de carbono. De momento señalaremos que 1 g de grasa contiene, como mínimo, el doble de energía aprovechable que 1 g de azúcar.

La Tabla 3.6 ilustra la variabilidad en la estructura de los ácidos grasos, en relación con la presencia de dobles enlaces entre los átomos de carbono. Los ácidos grasos sin dobles enlaces se denominan **ácidos grasos saturados**, puesto que cada átomo de carbono presenta el máximo número posible de átomos de carbono unidos a él (Figura 3.28a). La fórmula general de un ácido graso saturado con n átomos de carbono es $C_nH_{2n}O_2$. Los **ácidos grasos insaturados** contienen uno o más dobles enlaces. La presencia de insaturaciones afecta a la forma y estructura de la molécula, de la cual los ácidos grasos pueden ser parte. Los ácidos grasos saturados tienen colas largas y rectas, que pueden empaquetarse estrechamente, mientras que los dobles enlaces originan dobleces en la molécula, que dificultan el empaquetamiento (Figura 3.28b).

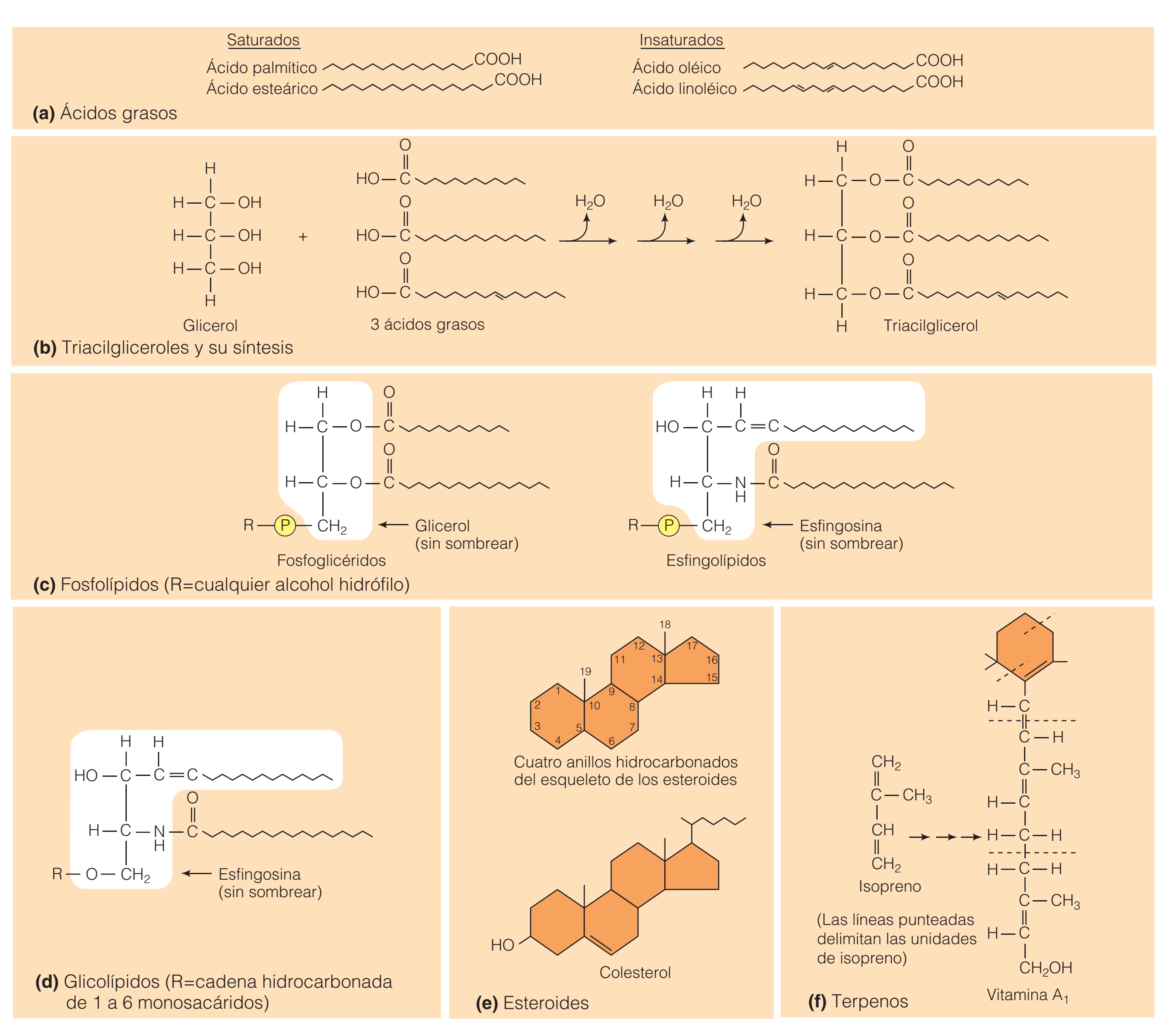
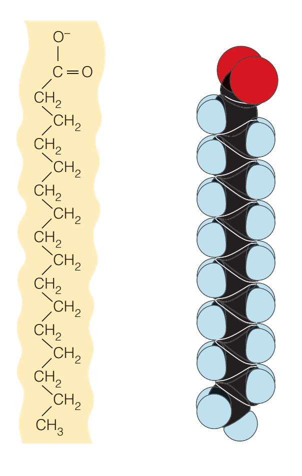


Figura 3.27 Las principales clases de lípidos. Las líneas en zigzag de las figuras **a-d** representan a las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos, con un grupo CH_3 en su extremo. Cada vértice representa un grupo metileno (—CH_2—).

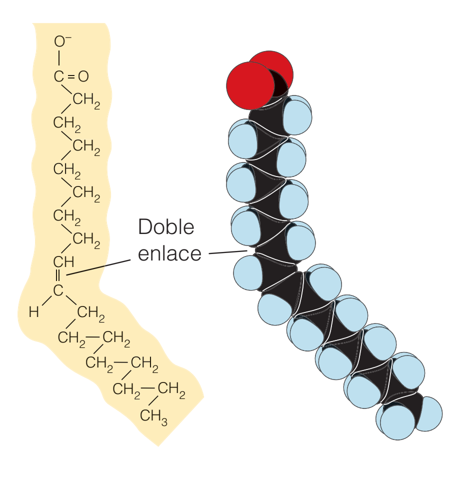
Tabla 3.6 Nomenclatura de los ácidos grasos*

Número de carbonos	Número de dobles enlaces	Nombre común	Nombre sistemático	Fórmula
12	0	Laurato	*n*-dodecanoato	$CH_3(CH_2)_{10}COO^-$
14	0	Miristato	*n*-tetradecanoato	$CH_3(CH_2)_{12}COO^-$
16	0	Palmitato	*n*-hexadecanoato	$CH_3(CH_2)_{14}COO^-$
18	0	Estearato	*n*-octadecanoato	$CH_3(CH_2)_{16}COO^-$
20	0	Araquidato	*n*-eicosanoato	$CH_3(CH_2)_{18}COO^-$
16	1	Palmitoleato	*cis*-Δ^9-hexadecenoato	$CH_3(CH_2)_5CH{=}CH(CH_2)_7COO^-$
18	1	Oleato	*cis*-Δ^9-octadecenoato	$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COO^-$
18	2	Linoleato	*cis, cis*-Δ^9, Δ^{12}-octadecadienoato	$CH_3(CH_2)_4(CH{=}CHCH_2)_2(CH_2)_6COO^-$
18	3	Linolenato	Todo *cis*-Δ^9, Δ^{12}, Δ^{15}-octadecatrienoato	$CH_3(CH_2)_4(CH{=}CHCH_2)_3(CH_2)_6COO^-$
20	4	Araquidonato	Todo *cis*-Δ^5, Δ^8, Δ^{11}, Δ^{14}-eicosatetraenoato	$CH_3(CH_2)_4(CH{=}CHCH_2)_4(CH_2)_2COO^-$

* Los nombres comunes, sistemáticos y las fórmulas corresponden a los de las formas ionizadas (aniónicas) de los ácidos grasos, que es en la que están presentes al pH casi neutro de la mayoría de las células. Para el nombre y las estructuras no iónicas de los ácidos grasos se debe anteponer en cada caso la palabra «ácido», reemplazar las terminaciones «-ato» con «-ico», y sustituir la carga negativa con un átomo de hidrógeno.



(a) Palmitato (saturado)



(b) Oleato (insaturado)

Figura 3.28 Estructuras de ácidos grasos saturados e insaturados. (**a**) Palmitato, ácido graso saturado de 16 átomos de carbono. (**b**) Oleato, ácido graso insaturado de 18 átomos de carbono. El modelo espacial enfatiza la forma general de la molécula. Obsérvese el ángulo que produce el doble enlace en la molécula del oleato.

Los triacilgliceroles son lípidos de reserva

Los **triacilgliceroles**, también llamados *triglicéridos*, están formados por una molécula de glicerol a la cual se unen tres ácidos grasos. Como se observa en la Figura 3.27b el **glicerol** es un alcohol de tres átomos de carbono, con un grupo hidroxilo en cada carbono. Los ácidos grasos se unen al glicerol por *enlaces éster*, que se forman por pérdida de agua. Los triacilgliceroles se sintetizan paso a paso, con la adición de un ácido graso cada vez. Los *monoacilgliceroles* sólo están esterificados por un ácido graso, los *diacilgliceroles* por dos y los *triacilgliceroles* por tres. Los tres ácidos grasos de un determinado triacilglicerol no tienen por qué ser idénticos. Pueden y, de hecho, es lo frecuente, variar en la longitud de la cadena, en el grado de insaturación o incluso en ambos.

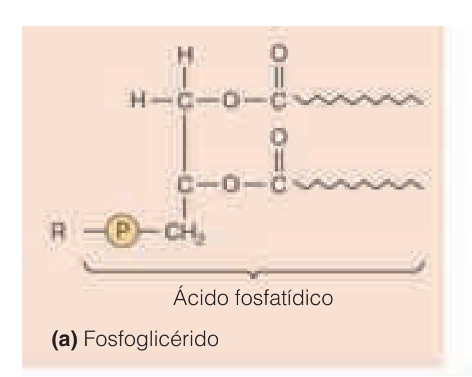
La principal función de los triacilgliceroles es el almacenamiento de energía, como veremos en nuestra discusión sobre el metabolismo energético en el Capítulo 10. En algunos animales, los triacilgliceroles confieren también aislamiento frente a temperaturas bajas. Los animales como las morsas, las focas y los pingüinos, que viven en climas extremadamente fríos, almacenan triacilgliceroles debajo de la piel y dependen de las propiedades aislantes de esta grasa, para poder sobrevivir en un ambiente tan adverso.

Los triacilgliceroles en los que predominan los ácidos grasos saturados, son generalmente sólidos a temperatura ambiente y se denominan grasas. La grasa está presente en el cuerpo de los animales, como se evidencia en la mayoría de los filetes de carne, en la gran cantidad de tocino que se obtiene como subproducto en las industrias cárnicas y en la opinión extendida de la gente de que está «echando grasa». En los vegetales, la mayoría de los triacilgliceroles son líquidos a temperatura ambiente, como sugiere el término *aceites vegetales*. Como los ácidos grasos de los aceites son predominantemente insaturados, sus cadenas hidrocarbonadas se retuercen, previniendo el empaquetamiento ordenado de las moléculas. El resultado es que los aceites vegetales tienen puntos de fusión más bajos que la mayoría de las grasas animales. Los aceites vegetales pueden ser convertidos en productos sólidos, como la margarina, por hidrogenación parcial (saturación) de sus dobles enlaces, un proceso que analizaremos al final del capítulo en el Problema 3.14.

Los fosfolípidos son importantes en la estructura de las membranas

Los fosfolípidos constituyen la tercera clase de lípidos (Figura 3.27c). Son similares a los triacilgliceroles en algunos detalles químicos, pero difieren marcadamente en sus propiedades y en su papel en la célula. En primer lugar, los fosfolípidos son importantes en la estructura de las membranas. De hecho, como vimos en el Capítulo 2, son críticos para la estructura en forma de bicapa presente en todas las membranas (*véase* la Figura 2.12). En términos químicos, los fosfolípidos son *fosfoglicéridos* o *esfingolípidos* (Figura 3.27c, izquierda y derecha, respectivamente).

Los **fosfoglicéridos** son los fosfolípidos predominantes en la mayoría de las membranas. Como los triacilgliceroles, los fosfoglicéridos están formados ácidos grasos que esterifican a una molécula de glicerol. Sin embargo, el componente básico de un fosfoglicérido es el **ácido fosfatídico**, que tiene sólo dos ácidos grasos y un grupo fosfato (Figura 3.29a). El ácido fosfatídico es un intermediario clave en la síntesis de otros fosfoglicéridos, pero en sí mismo es poco abundante en las membranas. En lugar de esto, los fosfoglicéridos de membrana tienen, invariablemente, un pequeño alcohol hidrófilo unido al fosfato por un enlace éster, representado en la Figura 3.29a como un grupo R. El alcohol suele ser *serina*, *etanolamina*, *colina* o *inositol* (Figura 3.29b). Excepto el inositol, estos alcoholes tienen un grupo amino que está protonado y, por tanto, cargado al pH celular. La presencia yuxtapuesta de un fosfato cargado negativamente y un amino cargado positivamente, con-



Serina Etanolamina Colina Inositol

(b) Los grupos R más frecuentes en los fosfoglicéridos

Figura 3.29 Estructuras de fosfoglicéridos comunes. (**a**) Un fosfoglicérido está formado por una molécula de ácido fosfatídico (glicerol esterificado con dos ácidos grasos y un grupo fosfato) y un pequeño alcohol de naturaleza polar, representado por R y también esterificado por el grupo fosfato. (**b**) Los cuatro grupos R encontrados más comúnmente en los fosfoglicéridos, son la serina, la etanolamina, la colina y el inositol; los tres primeros presentan un grupo amino cargado positivamente o un átomo de nitrógeno.

vierte a estos fosfoglicéridos en moléculas eléctricamente neutras, y con una cabeza altamente polar.

La combinación de una cabeza altamente polar y dos largas cadenas no polares confiere a los fosfoglicéridos las características anfipáticas que son críticas para desempeñar su papel en la estructura de la membrana. Como vimos previamente, los ácidos grasos pueden variar considerablemente, tanto en la longitud, como en la presencia y posición de las instauraciones. En las membranas, los ácidos grasos más comunes son los de 16 y 18 átomos de carbono y lo normal es que la molécula del fosfoglicérido presente un ácido graso saturado y el otro insaturado. La longitud y el grado de insaturación condicionan profundamente la fluidez de la membrana. La fluidez es una propiedad crucial de la membrana y, por tanto, no debe sorprender que las células de muchos organismos sean capaces de regular la longitud e insaturación de las cadenas lipídicas.

Además de fosfoglicéridos, algunas membranas contienen otro tipo de fosfolípidos, denominados **esfingolípidos**. Como sugiere su nombre, están formados, no por glicerol, sino por el aminoalcohol **esfingosina**. En la Figura 3.27c se muestra que la molécula de esfingosina tiene una larga cadena hidrocarbonada, con una única insaturación cerca del extremo polar. A través de su grupo amino, la esfingosina puede formar un enlace amida por el que se une a un ácido graso de cadena larga. La molécula resultante se llama ceramida y está formada por una región polar flanqueada por dos largas colas apolares. Esta molécula, en principio lineal, se dobla en horquilla por la región polar, gracias a la naturaleza apolar de ambas colas, que tienden a enrollarse. El resultado final es que su forma se parece a la de los fosfolípidos.

El grupo hidroxilo del átomo de carbono 1 de la esfingosina aflora de la cabeza de esta molécula en forma de horquilla. Un esfingolípido se forma cuando uno de los múltiples grupos polares se une a este grupo hidroxilo. Realmente existe toda una familia de esfingolípidos, que difieren sólo en la naturaleza química del grupo polar unido al grupo hidroxilo de la ceramida (es decir, el grupo R de la Figura 3.27c). Las esfingomielinas, por ejemplo, tienen etanolamina o colina, siendo, por tanto, similares a los fosfoglicéridos, tanto en su forma general, como en la naturaleza química de su cabeza polar.

Los glicolípidos son componentes especializados de la membrana

Los **glicolípidos** son derivados de la esfingosina (u ocasionalmente del glicerol) que contienen un grupo carbohidrato en lugar del grupo fosfato (Figura 3.27d). Los que contienen esfingosina son denominados *glicoesfingolípidos*. El grupo carbohidrato unido a un glicolípido puede tener de una a seis unidades de azúcar, que puede ser D-glucosa, D-galactosa o N-acetil-D-galactosamina. Los grupos carbohidrato, como los grupos fosfato, son hidrófilos, lo cual confiere al glicolípido una naturaleza anfipática. Los glicolípidos son constituyentes especializados de algunas membranas, especialmente en ciertas células vegetales y en células del sistema nervioso. En estas células, los glicolípidos son muy abundantes en la cara externa de la membrana plasmática.

Cuando los esfingolípidos fueron descubiertos por Johann Thudicum a finales del siglo XIX, su papel biológico era tan enigmático como la Esfinge, la cual eligió para dar-

les su nombre. Hoy día sabemos que los esfingolípidos en general y los glicoesfingolípidos en particular, son lugares de reconocimiento en la superficie de la membrana plasmática, como veremos más adelante en el Capítulo 14.

Los esteroides son lípidos con muchas funciones

Los **esteroides** constituyen otra categoría más de lípidos. Son derivados de un esqueleto hidrocarbonado formado por cuatro anillos (Figura 3.27e), que los hacen estructuralmente diferentes del resto de los lípidos. De hecho, la única propiedad común con otras clases de lípidos es que son relativamente apolares y, por tanto, hidrófobos. Como se ilustra en la Figura 3.30, los esteroides difieren entre sí por el número y posición de los dobles enlaces y por los grupos funcionales.

Los esteroides aparecen sólo en las células eucarióticas. El esteroide más abundante en células animales es el **colesterol** cuya estructura podemos ver en la Figura 3.27e. El colesterol es una molécula anfipática, con una cabeza polar (el grupo hidroxilo en la posición tres) y un cuerpo y cola hidrocarbonados (el esqueleto de cuatro anillos y la cadena hidrófoba lateral en la posición 17). Puesto que la mayoría de la molécula es hidrófoba, el colesterol aparece mayoritariamente en las membranas. Está presente en células animales, tanto en la membrana plasmática, como en la mayoría de los órganulos de membrana, excepción hecha de la membranas internas de las mitocondrias y los cloroplastos. En otras células eucarióticas, aparecen esteroides similares, como el *estigmasterol* y el *sitoesterol* en células vegetales y el *ergosterol* en células fúngicas.

El colesterol es el punto de partida para la síntesis de todas las **hormonas esteroídicas** (Figura 3.30), entre las que se incluyen las *hormonas sexuales* masculinas y femeninas, los *glucocorticoides* y los *mineralcorticoides*. Las principales hormonas sexuales son los *estrógenos*, producidos por el ovario de las hembras (por ejemplo, el *estradiol*) y los *andrógenos* producidos por los testículos de los machos (por ejemplo, la *testosterona*). Los *glucocorticoides* (por ejemplo, el *cortisol*) pertenecen a una familia de hormonas que promueven la gluconeogénesis (síntesis de glucosa) y suprimen las reacciones inflamatorias. Los *mineralcorticoides* como la *aldosterona* regulan el balance iónico y estimulan la reabsorción de iones sodio, cloruro y bicarbonato en el riñón.

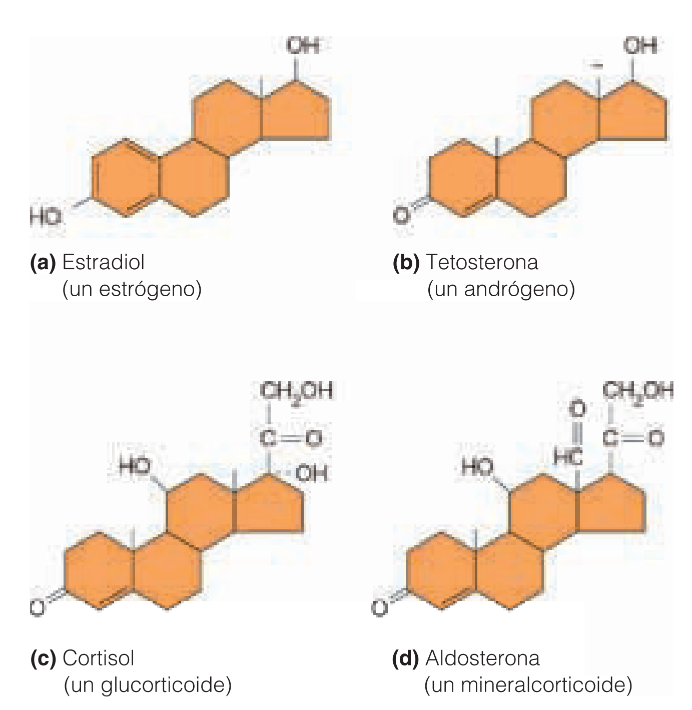


Figura 3.30 Estructuras de hormonas esteroídicas comunes. Entre los múltiples esteroides sintetizados a partir del colesterol, están las hormonas (**a**) estradiol, un estrógeno; (**b**) testosterona, un andrógeno; (**c**) cortisol, un glucocorticoide y (**d**) aldosterona, un mineralcorticoide.

Los terpenos se forman a partir del isopreno

La última clase de lípidos mostrados en la Figura 3.27 son los **terpenos**, que se sintetizan a partir del *isopreno*, compuesto de cinco átomos de carbono; por ello, son también denominados *isoprenoides*. El isopreno y sus derivados se unen en varias combinaciones para producir sustancias tales como la *vitamina* A_1 (Figura 3.27f), los *pigmentos carotenoides* y los *dolicoles*, que están implicados en la activación de derivados de azúcares y, por último, los transportadores de electrones, como la *coenzima Q* y la *plastoquinona*, las cuales analizaremos en los Capítulos 10 y 11.

Perspectiva

Los tres tipos de macromoléculas predominantes en la célula son las proteínas, los ácidos nucleicos y los polisacáridos. Las proteínas y los ácidos nucleicos son moléculas que portan información, que depende directa o indirectamente del código genético; éste es el que determina el orden de aminoácidos y nucleótidos, que es crítico para la función celular. Los polisacáridos no requieren tal información; generalmente están formados por uno o pocos tipos de unidades repetitivas y su función es exclusivamente estructural o de reserva.

Las proteínas están formadas por cadenas lineales de aminoácidos cuyas propiedades químicas dependen de sus grupos R. La secuencia aminoacílica, o estructura primaria de un polipéptido, es esencial porque contiene la mayoría, sino toda la información necesaria para especificar los plegamientos u orientación de la cadena (estructura secundaria), la forma general del polipéptido (estructura

terciaria) y, en el caso de proteínas multiméricas, las asociaciones con otros polipéptidos (estructura cuaternaria). Uno de los motores que permiten el plegamiento e interacciones de un polipéptido es la tendencia de los aminoácidos hidrófobos a evitar un ambiente acuoso. En la estabilización de la estructura proteica, son también importantes los puentes de hidrógeno, los enlaces iónicos, las fuerzas de van der Waals y los puentes disulfuro covalentes.

Los ácidos nucleicos presentan una forma que está también dictada por la naturaleza química de sus subunidades. Esto se comprueba más fácilmente con la doble hélice del DNA, en la cual el apareamiento de bases complementarias (A con T, C con G) se estabiliza con puentes de hidrógeno. El descubrimiento de la estructura en doble hélice del DNA, ha sido uno de los avances definitivos de la biología en el siglo XX.

Los polisacáridos son cadenas de monosacáridos unidos entre sí por enlaces glicosídicos α o β. La diferencia es crítica, pues los enlaces α son fácilmente digeribles por los animales y, por tanto, los polisacáridos con ese tipo de enlace, como el glucógeno o el almidón, pueden servir como moléculas de reserva. El enlace glicosídico β, que no es digerible por los animales, es característico de los polisacáridos estructurales, como la celulosa y la quitina, a las cuales confiere una rigidez apropiada para dicha función.

Los lípidos no son macromoléculas, pero se incluyen en este capítulo por su importancia como constituyentes de las células (especialmente en membranas) y por su frecuente asociación con macromoléculas, particularmente proteínas. Los lípidos difieren sustancialmente en su estructura química, pero todos ellos comparten la propiedad de ser solubles en disolventes orgánicos, pero no en agua. Los principales tipos de lípidos son los triacilgliceroles, que dan lugar a las grasas y los aceites, los fosfolípidos y esfingolípidos, propios de las membranas, los glicolípidos, implicados en fenómenos de reconocimiento y los esteroides y terpenos, responsables de múltiples funciones en las células eucarióticas.

Problemas

Los problemas de mayor dificultad están marcados con un •.

3.1 Los polímeros y sus propiedades. Indique cuáles son las propiedades aplicables a cada uno de los seis polímeros biológicos listados. Cada polímero tiene varias propiedades, por lo que una propiedad determinada puede ser marcada más de una vez.

Polímeros

(a) Celulosa
(b) RNA mensajero
(c) Proteína globular
(d) Amilopectina
(e) DNA
(f) Proteína fibrilar

Propiedades

1. Polímero de cadena ramificada
2. Localización extracelular
3. Enlaces glicosídicos
4. Macromolécula de información
5. Enlace peptídico
6. Unión
7. Enlace fosfodiéster
8. Nucleósidos trifosfatos
9. Posible estructura helicoidal
10. La síntesis requiere un molde

3.2 Estabilidad de la estructura proteica. En la generación y mantenimiento de la estructura de las proteínas, intervienen diferentes tipos de enlaces e interacciones. Señale 4 ó 5 de dichas interacciones, cite un ejemplo de un aminoácido que puede estar implicado en cada una de ellas e indique qué nivel (es) de estructura proteica puede ser generada o estabilizada por un tipo dado de enlace o interacción.

3.3 Localización de los aminoácidos en las proteínas. Dependiendo de su afinidad relativa por agua, los aminoácidos pueden localizarse, bien en el interior, bien en el exterior de una proteína globular.

(a) Para cada uno de los siguientes pares de aminoácidos, elegir cuál es el que aparecerá con mayor probabilidad en el interior de una proteína y explicar por qué:

alanina; glicina	glutamato; aspartato
tirosina; fenilalanina	metionina; cisteína

(b) Explique por qué los residuos de cisteína con los grupos sulfhidrilo libres tienden a localizarse en el exterior en una proteína, mientras que los que están formando puentes disulfuro son más proclives a aparecer en el interior de la molécula.

3.4 Anemia falciforme. La anemia falciforme es un ejemplo inusual de los efectos drásticos que puede tener la sustitución de un único aminoácido en la estructura y función de una proteína.

(a) Dada la naturaleza química del glutamato y de la valina, sugiera por qué la sustitución de esta última por el primero, en la posición 6 de la cadena β, podría ser especialmente deletérea.

(b) Proponga algunos aminoácidos cuya sustitución por el glutamato en la posición 6 de la cadena β, tendrían menos probabilidad de alterar la función de la hemoglobina.

(c) ¿Puede explicar por qué, en algunos casos, dos proteínas pueden diferir en varios puntos de su secuencia aminoácilica y ser aún muy similares en su estructura y función?

3.5 Pelo frente a seda. La queratina α del pelo humano es un buen ejemplo de proteína fibrilar con predominio de estructura en hélice α. La fibroína de la seda es también una proteína fibrosa, pero formada básicamente por láminas β. La fibroína es un polímero donde alternan, esencialmente, glicinas y alaninas,

mientras que la queratina α contiene la mayoría de los aminoácidos comunes y tiene muchos puentes disulfuro.

(a) Si usted fuera capaz de agarrar por los extremos al polipéptido de queratina α y estirarlo, se daría cuenta de que es extensible (se puede estirar hasta aproximadamente el doble de su longitud, en condiciones de calor húmedo) y, a la vez, elástico (al cesar la tensión, vuelve a su longitud normal). Por contra, la fibroína es virtualmente inextensible, pero tiene una gran resistencia a tensión. Explique estas diferencias.

(b) ¿Podría sugerir por qué la fibroína adopta una estructura laminar, mientras que la queratina α es una hélice α, que incluso revierte espontáneamente a la forma helicoidal cuando es estirada artificialmente?

3.6 La «permanente» que no lo es. La «permanente» que le ofrecen en su salón de belleza, depende de la reestructuración de los múltiples puentes disulfuro de la queratina, que dan a su pelo su forma característica. Para cambiar la forma de su pelo (es decir, ondularlo o rizarlo) el peluquero debe tratar previamente su pelo con un agente reductor de sulfhidrilos, usar luego rulos o rizadores que moldeen la forma deseada y, por último, emplear un agente oxidante.

(a) ¿Cuál es la base química de la «permanente»? No se olvide de incluir en su explicación el uso de los agentes reductores y oxidantes.

(b) ¿Por qué supone que la «permanente» no es «permanente»? (Explicar por qué la onda o el rizo se pierden gradualmente durante las semanas siguientes a su visita al peluquero.)

(c) ¿Puede sugerir alguna explicación para los rizos naturales del pelo?

3.7 Particularidades de los ácidos nucleicos. Indique cuáles de las siguientes propiedades de los ácidos nucleicos, son ciertas solamente para el DNA, el RNA, para ambos o para ninguno.

(a) Contiene la base adenina.

(b) Contiene el nucleótido desoxitimidina monofosfato.

(c) Aparece sólo en forma monocatenaria.

(d) Está implicada en los procesos de síntesis de proteínas en el citoplasma de las células del hígado.

(e) Se sintetiza en un proceso que requiere el apareamiento de bases.

(f) Es una molécula con direccionalidad inherente, con un extremo N-terminal y otro C-terminal.

3.8 El tamaño de las moléculas del DNA. La doble hélice del DNA contiene exactamente 10 pares de nucleótidos por vuelta y cada vuelta añade 3,4 nm de longitud. La molécula del DNA circular de *E. coli* tiene unos 4 millones de pares de nucleótidos y un peso molecular de aproximadamente $2{,}8 \times 10^9$.

(a) ¿Cuánto mide el perímetro de la circunferencia de la molécula del DNA de *E. coli*? ¿Qué problemas podría conllevar esto para una célula que sólo tiene 2 μm de longitud?

(b) El DNA mitocondrial humano es también un dúplex circular con un diámetro de unos 1,8 μm. ¿Cuántos pares de nucleótidos contendrá? Si se precisan unos 1.000 nucleótidos del DNA para codificar (especificar la secuencia de aminoácidos) un polipéptido tipo, cuantos polipéptidos podrá codificar el DNA mitocondrial?

(c) ¿Cuál es el peso (en gramos) de un par de nucleótidos? ¿Cuántos pares de nucleótidos hay en los 6 picogramos (6×10^{-12}) de DNA dicatenario presente en los núcleos de la mayoría de las células de su cuerpo?

(d) ¿Cuál es la longitud total de los 6 picogramos de DNA presentes en el núcleo de una célula humana?

3.9 Polisacáridos de reserva. Los polisacáridos de reserva glucógeno y amilopectina son los únicos ejemplos frecuentes de polímeros celulares ramificados. Ambos se degradan exolíticamente, lo que quiere decir que se eliminan una a una las unidades terminales de glucosa.

(a) ¿Qué ventaja puede suponer para un polisacárido de reserva el tener una estructura ramificada frente a una lineal?

(b) ¿Puede preverse alguna complicación metabólica en el proceso de degradación del glucógeno? ¿Cómo puede acometer esto la célula?

(c) ¿Por qué las células que degradan amilosa en vez de amilopectina tienen enzimas capaces de romper los enlaces glicosídicos, tanto endolíticamente (desde el interior), como exolíticamente?

(d) ¿Cómo podría explicar que el polisacárido celulosa no presenta ramificaciones?

3.10 Estructura de los hidratos de carbono. Dibujar las proyecciones de Haworth de la gentiobiosa, la rafinosa y un dextrano, a partir de las siguientes descripciones:

(a) La gentiobiosa es un disacárido propio de la genciana y otras plantas. Está formada por dos moléculas de β-D-glucosa unidas por un enlace $\beta(1 \rightarrow 6)$ glicosídico.

(b) La rafinosa es un trisacárido presente en la remolacha azucarera. Está constituida por una unidad de α-D-galactosa, otra de α-D-glucosa y otra de β-D-fructosa, con la galactosa unida a la glucosa por un enlace glicosídico $\alpha(1 \rightarrow 6)$ y la glucosa unida a la fructosa por un enlace $\alpha(1 \rightarrow 2)$.

(c) Los dextranos son polisacáridos producidos por ciertas bacterias. Son polímeros de α-D-glucosa, con uniones glicosídicas $\alpha(1 \rightarrow 6)$ con ramificaciones frecuentes $\alpha(1 \rightarrow 3)$. Dibuje una porción de un dextrano, incluyendo una ramificación.

3.11 Buscando las diferencias. Especifique una propiedad que permita distinguir los pares de moléculas indicados y señalar dos pruebas químicas diferentes que puedan ser usadas para dicha distinción:

(a) La proteína insulina y el DNA del gen que codifica la insulina.

(b) El DNA que codifica la insulina y el RNA mensajero de la insulina.

(c) Almidón y celulosa.

(d) Amilosa y amilopectina.

(e) La proteína monomérica mioglobina y la tetramérica hemoglobina.

(f) Un triacilglicerol y un fosfolípido con un contenido similar en ácidos grasos.

(g) Un glicolípido y un esfingolípido.

(h) Un polisacárido de la pared celular bacteriana y la quitina.

•**3.12 Algodón y patatas.** Una fibra de algodón está formada, casi exclusivamente, por celulosa, mientras que el tubérculo de una patata contiene fundamentalmente almidón. El algodón es resistente, fibroso y virtualmente insoluble en agua. Por contra, el almidón de la patata no es resistente ni fibroso y se puede dispersar en agua caliente formando una solución turbia. Pese a todo, tanto las fibras de algodón, como el tubérculo de la patata, consisten básicamente en polímeros de D-glucosa con uniones $(1 \rightarrow 4)$.

(a) ¿Cómo pueden dos polímeros formados a partir de la misma subunidad tener propiedades tan diferentes?

(b) ¿Cuál es la ventaja de las propiedades respectivas?

•**3.13 Pensando en lípidos.** Basándose en las propiedades de los lípidos discutidas en este capítulo, usted debe ser capaz de contestar a las siguientes preguntas:

(a) ¿Cómo definiría un lípido? ¿En qué sentido la definición es diferente de la de proteínas, ácidos nucleicos e hidratos de carbono?

(b) Ordene por su polaridad decreciente a los siguientes lípidos: colesterol, estradiol, ácido graso, fosfatidil colina, triglicérido. Explique el razonamiento.

(c) Una molécula de esfingomielina, ¿se parece más a una molécula de fosfatidil colina esterificada por dos moléculas de palmitato o a una fosfatidil colina esterificada por un palmitato y un oleato? Explique el razonamiento.

(d) Asuma que su compañero de laboratorio, Mort, ha determinado la temperatura de fusión de los siguientes ácidos grasos: arquídico, linoleico, linolénico, oleico, palmítico y esterárico. Mort anotó los puntos de fusión, pero se olvidó de indicar a qué ácidos grasos correspondían. Asignar razonadamente las temperaturas de fusión (en °C) a cada ácido graso: −11, +5, +16, +63, +70, +76,5.

(e) Indicar cuál es la parte hidrófoba de las siguientes moléculas: fosfatidil serina, esfingomielina, colesterol, triacilglicerol.

3.14 Margarina. Una popular marca de margarina especifica en la etiqueta de la lata que el producto está compuesto por «aceites de palma y de semillas de soja y algodón, parcialmente hidrogenados».

(a) ¿En qué consiste químicamente la hidrogenación parcial?

(b) ¿Qué aspecto tendría el producto de la lata antes de la hidrogenación parcial?

(c) ¿Cuál es el efecto físico de la hidrogenación parcial?

Bibliografía recomendada

Las referencias con importancia histórica están marcadas con •.

Referencias generales y revisiones

Bhagavan, N. Y. *Medical Biochemistry*. San Diego: Harcourt/Academic Press, 2002.

•Hunter, G. K. *Vital Forces: The Discovery of the Molecular Basis of Life*. San Diego: Academic Press, 2000.

Jardetzky, O. y M. D. Finucane. *Dynamics, Structure, and Function of Biological Macromolecules.*Washington, DC: IOS Press, 2001.

Lehninger, A. L., D. L. Nelson y M. M. Cox. *Principles of Biochemistry*, 3rd ed. New York:Worth, 1999.

Malacinski, G. M. *Essentials of Molecular Biology*, 4th ed. Boston: Jones y Barletts, 2003.

Mathews, C. K., K. E. van Holde y K. G. Ahern. *Biochemistry*, 3rd ed. Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings, 2000.

Metzler, D. E. *Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells*. San Diego: Academic Press, 2001.

Murray, R. K. *Harper's Illustrated Biochemistry*, 26th ed. New York: McGraw Hill, 2003.

Thornton, R. M. *The Chemistry of Life*. San Francisco, CA: Benjamin/Cummings, 2000.

Wald, G. The origins of life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 52 (1994): 595.

Proteínas

•Bernard, S. A. y F.W. Dahlquist. *Classic Papers on Protein Structure and Function*. Sausalito, CA: University Science, 2002.

Bienstock, R. J. Molecular modeling of protein structures. *Sci.Med.* 4 (1997): 54.

Branden, C. y J. Tooze. *Introduction to Protein Structure*, 2nd ed. New York: Garland Press, 1999.

Danchin, A. From protein sequence to function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9 (1999): 363.

Edgcomb, S. P. P. y K. P.Murphy. Structural energetics of protein folding and binding. *Curr. Opin. Biotech.* 11 (2000): 62.

Ellis, R. J., ed. *The Chaperonins*. New York: Academic Press, 1996. Ezzell, C. Proteins rule. *Sci. Amer.* 286 (April 2002): 40.

Flannery, M. C. Proteins: The unfolding and folding picture. *Amer. Biol. Teacher* 61 (1999): 150.

Lesk, A.M. *Introduction to Protein Architecture: The Structural Biology of Proteins*. Oxford: Oxford University Press, 2001.

Moult, J. y E. Melamud. From fold to function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10 (2000): 384.

Murphy, K.P., ed. *Protein Structure, Stability, and Folding*. Totowa, NJ: Humana Press, 2001.

Orengo, C. A., A. E. Todd y J. M. Thornton. From protein structure to function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9 (1999): 374.

Pain, R. H. *Mechanisms of Protein Folding*. New York: Oxford University Press, 2000.

Pennisi, E. Taking a structural approach to understanding proteins. *Science* 279 (1998): 978.

Petsko, G. A. y D. Ringe. *Protein Structure and Function*. Sunderland, MA: Sinauer Assoc., 2004.

Ringler, P. y G. E. Schulz. Self-assembly of proteins into designed networks. *Science* 302 (2003): 106.

Sheu, S. Y., D. Y. Yang, H. L. Selzle y E.W. Schlag. Energetics of hydrogen bonds in peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 100 (2003): 12683.

Ácidos nucleicos

•Crick, F. H. C. The structure of the hereditary material. *Sci. Amer* (octubre de 1954): 54.

Davies, K. *Cracking the Genome: Inside the Race to Unlock Human DNA*. New York: The Free Press, 2001.

•Dickerson, R. E. The DNA helix and how it is read. *Sci. Amer*. 249 (diciembre de 1983): 94.

Ezzell, C. The business of the human genome. *Sci. Amer*. (July 2000): 48.

Forsdye, D. R. Chargaff 's legacy. *Gene* 261 (2000): 127.

Frouin, I., A.Montecucco, S. Spadari, and G.Maga. DNA replication: A complex matter. *EMBO Reports* 4 (2003): 666.

•Portugal, F. H. y J. S. Cohen. *The Century of DNA: A History of the Discovery of the Structure and Function of the Genetic Substance*. Cambridge, MA: MIT Press, 1977.

Skolnick, J. y J. S. Fetrow. From genes to protein structure and function: novel applications of computational approaches in the genomic era. *Trends Biotech*. 18 (2000): 34.

Venter, J. C. et al. The sequence of the human genome. *Science* 291 (2001): 1304.

•Watson, J. *A Passion for DNA*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.

Hidratos de carbono y lípidos

Flatt, J. P. Use and storage of carbohydrate and fat. *Amer. J. Clin. Nutr*. 61 (1995): 952S.

Kobata, A. Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. *Europ. J. Biochem*. 209 (1992): 483.

Lindhorst, T. K. *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Weinheim, Germany:Wiley-VCH, 2000.

Merrill, A. H., Jr., E. M. Schmelz, D. L. Dillehay, S. Spiegel, J. A. Shayman, J. J. Schroeder, R. T. Riley, K. A.Voss y E.Wang. Sphingolipids—the enigmatic lipid class: Biochemistry, chemistry, physiology, and pathophysiology. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 142 (1997): 208.

Vance, D. E. y J. E.Vance, eds. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes*. New Comprehensive Biochemistry,Vol. 20. New York: Elsevier, 1991.

4

Células y orgánulos

En los dos capítulos precedentes, nos hemos encontrado con los principales tipos de moléculas que hay en las células, así como con algunos de los principios que gobiernan el ensamblaje de estas moléculas en estructuras supramoleculares, de las cuales están hechas las células y sus orgánulos (*véase* la Figura 2.14). Ahora ya estamos listos para centrar nuestra atención directamente en estas células y en sus orgánulos.

Propiedades y estrategias de las células

Conforme vayamos considerando qué son y cómo funcionan las células, irán apareciendo propiedades que nos permitirán la clasificación de éstas en base a la complejidad de organización, tamaño, forma y especializaciones.

Todos los organismos son eucariotas, eubacterias o arqueas

Con la llegada del microscopio electrónico, los biólogos fueron capaces de reconocer dos tipos de organización celular: la más simple, característica de las bacterias y la más compleja, propia de los demás tipos de células. En base a esto, los organismos se clasificaron inicialmente en dos amplios grupos, los procariotas (bacterias) y los eucariotas (el resto de las formas de vida). La principal diferencia entre los dos grupos está en que las células eucariontes tienen un núcleo verdadero (*eu* quiere decir en griego «verdadero» o «genuino»; *karyon* significa «núcleo»), rodeado por una membrana, mientras que las células procariontes carecen de él (*pro-* significa «antes», sugiriendo una forma de vida evolutivamente anterior).

Atendiendo a criterios moleculares y bioquímicos, especialmente el análisis de la secuencia en los RNAs ribosómicos (rRNAs), sabemos hoy que los procariotas pueden, a su vez, subdividirse en **eubacterias** y **arqueas**. Las eubacterias («bacterias verdaderas») engloban a la mayoría de las **bacterias** y a las **cianobacterias** (también llamadas algas verdeazuladas) actuales; en otras palabras, la mayoría de las bacterias. Las arqueas (también llamadas arqueobacterias) son parecidas a las eubacterias por su forma celular, pero molecular y bioquímicamente son tan diferentes de las eubacterias como lo son de las células eucariontes. Las arqueas son consideradas los descendientes modernos de una forma procarionte muy antigua, que difería sustancialmente de los ancestros de las eubacterias actuales. (*Archae-* es un prefijo griego que significa «antiguo» u «original»). Las arqueas actuales se subdividen en tres grupos principales: las *metanobacterias*, que obtienen la energía convirtiendo el dióxido de carbono y el oxígeno en metano; las *halobacterias*, que pueden crecer en ambientes salinos (hasta 5,5 *M* de NaCl); y las *sulfobacterias*, que obtienen la energía a partir de compuestos sulfurosos. Algunas de estas arqueas son también *termoacidófilas*, es decir, que consiguen vivir en fuentes termales ácidas, en condiciones de pH tan bajo como 2 y temperaturas que pueden sobrepasar los 100 °C.

A partir de los trabajos de secuenciación del RNA llevados a cabo por Carl Woese, C. Fred Fox y otros, sabemos en la actualidad que los eucariotas, las eubacterias y las arqueas constituyen tres grupos diferentes de organismos. Aparte de las características propias de sus rRNAs, las células de cada grupo tienen un conjunto de identidades mole-

culares, bioquímicas y celulares específicas, así como propiedades en común, que incluyen a las RNA polimerasas (las enzimas que sintetizan RNA), la sensibilidad a inhibidores específicos de la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos y la presencia o ausencia de compartimientos intracelulares, rodeados o no de membrana (orgánulos).

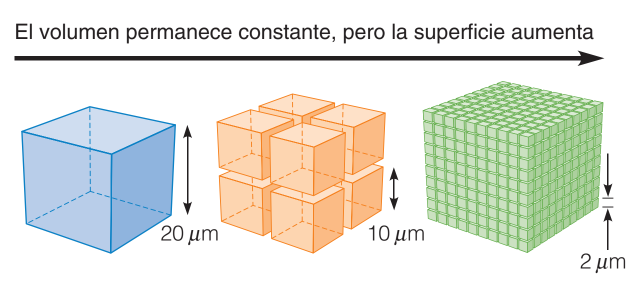
Las células tienen muchas formas y tamaños

Existe una gran variedad de tamaños perfiles y formas celulares. Algunas de las bacterias más pequeñas, por ejemplo, sólo tienen unos 0,2-0,3 μm de diámetro, ¡son tan pequeñas que caben unas 40.000 en la cabeza de una chincheta! En el otro extremo, se encuentran algunas células nerviosas, que tienen expansiones que pueden llegar a medir un metro o más. Aquellas que discurren por el cuello o las patas de una jirafa, son un ejemplo ilustrativo. Otros ejemplos citados muy a menudo, son los huevos de aves, especialmente los de avestruz, si bien hay que matizar que, aunque son realmente una célula, la mayoría de su volumen interno está ocupado por la yema? gran depósito de reserva nutricia destinada a la alimentación del embrión, que se desarrollará si el huevo es fecundado.

Prescindiendo de esos extremos, la mayoría de las células encajan dentro de un rango estrecho y predecible de tamaño. Por ejemplo, las células procariontes suelen medir de 1 a 5 μm de diámetro y la mayoría de las células de vegetales superiores y de animales oscilan entre los 10 y 50 μm. (Recuérdese que en el anexo 1A se describían las unidades empleadas para expresar las dimensiones de la célula y las estructuras celulares). Entre los factores que limitan el tamaño celular, los tres más importantes son los requerimientos de una adecuada relación superficie/volumen, la tasa de difusión de moléculas y la necesidad de mantener una concentración local adecuada de ciertas sustancias implicadas en diferentes procesos celulares. Seguidamente consideraremos cada uno de estos factores.

Relación superficie/volumen. En la mayoría de los casos, el factor más restrictivo para el tamaño celular, viene definido por la necesidad de mantener una adecuada **relación superficie/volumen**. El área es importante, puesto que en la superficie celular se producen los intercambios entre la célula y el medio. El volumen de la célula determina la cantidad de nutrientes que tendrán que ser importados, así como la cantidad de productos de desecho que deberán ser excretados, pero es la superficie la que determina la cantidad de membrana disponible para las citadas importación y excreción.

El problema de mantener la magnitud apropiada de superficie, se debe a que el volumen de una célula se incrementa al cubo con el aumento longitudinal del diámetro, mientras que la superficie se incrementa sólo al cuadrado. Considere como ejemplo, las células en forma de cubo que muestra la Figura 4.1. La célula de la izquierda tiene 20 μm de lado y un volumen de 8.000 μm^3 ($V = s^3$, donde $s = 20$ μm) y una superficie de 2.400 μm^2 ($A = 6s^2$). Así pues, la relación superficie/volumen es 2.400 μm^2/8.000 μm^3, o sea, 0,3 μm^{-1}. Si esta gran célula se divide en células más pequeñas, el volumen total permanece, pero la superficie aumenta. Así, la relación área/volumen se incrementa cuando la dimensión lineal de la célula disminuye. Las 1.000 células de la derecha tienen aún, en conjunto, un volumen de 8.000 μm^3 (1.000×2^3), pero la superficie total



Longitud de un lado	20 μm	10 μm	2 μm
Área total (alto × ancho × número de lados × número de cubos)	2.400 μm^2	4.800 μm^2	24.000 μm^2
Volumen total (largo × ancho × alto × número de cubos)	8.000 μm^3	8.000 μm^3	8.000 μm^3
Relación área volumen (área ÷ volumen)	0,3	0,6	3,0

Figura 4.1 Efecto del tamaño en la relación área/volumen. La célula grande de la izquierda, las ocho menores del centro y las 1.000 minúsculas de la derecha, tienen el mismo volumen total (8.000 μm^3), pero la superficie se incrementa conforme disminuye el tamaño. La relación superficie/volumen aumenta de izquierda a derecha, a la vez que disminuye la dimensión lineal de la célula. Así, 1.000 células procariontes de 2 μm de lado tienen una superficie total, que es cinco veces mayor que la de las cuatro células eucariontes pequeñas, de 10 μm de lado y diez veces mayor que la de una célula eucarionte de 20 μm de lado.

es de 24.000 μm^2 (1.000 $\times$ 6 $\times$ 2^2) y la relación área/volumen es 24.000 μm^2/8000 μm^3, es decir, 3,0 μm^{-1}.

Esta comparación ilustra una de las mayores limitaciones del tamaño celular: cuando una célula aumenta de tamaño, su superficie no lo hace en la misma medida que el volumen y el intercambio con el medio de las sustancias necesarias, se hace cada vez más problemático. Por tanto, el tamaño sólo puede incrementarse en un rango de valores, que permita que la membrana siga intercambiando adecuadamente sustancias con el medio. Una vez alcanzado el límite de la relación área/volumen, los subsiguientes aumentos en el tamaño generarán un incremento del volumen citoplásmico y, por tanto, unos requerimientos de intercambio mayores de los que se pueden acometer con el modesto incremento de la superficie de la membrana.

Algunas células, especialmente las que intervienen en la absorción, desarrollan soluciones que maximizan la superficie. La forma más frecuente de incrementar ésta, consiste en el desarrollo de invaginaciones y evaginaciones de la membrana. Por ejemplo, las células que tapizan el intestino delgado contienen multitud de expansiones en forma de dedo, denominadas *microvellosidades*, que aumentan considerablemente la superficie de la membrana y, por ende, la capacidad de absorción de dichas células (Figura 4.2).

Tasa de difusión de las moléculas. El tamaño celular viene también impuesto por la tasa a la que las moléculas se desplazan en la célula para alcanzar el lugar en el que van a ejercer su función. En general, las moléculas se mueven por el citoplasma (o en las membranas, en el caso de proteínas y lípidos de membrana) por difusión desde regiones de alta a baja concentración. El movimiento de las moléculas

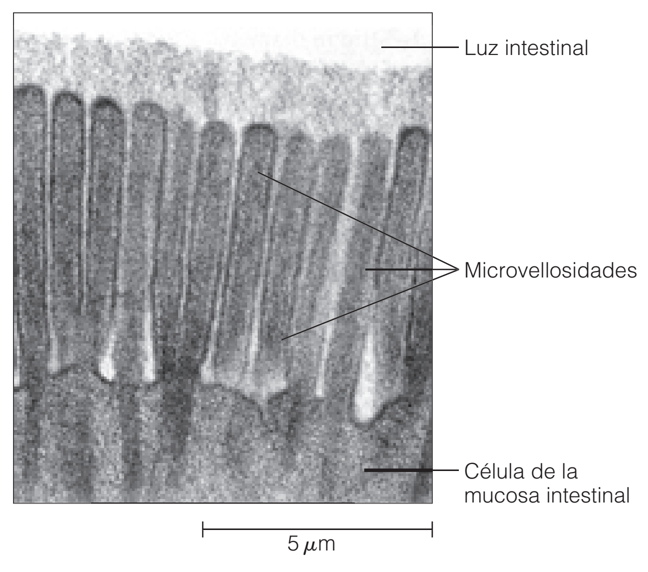


Figura 4.2 Microvellosidades de las células de la mucosa intestinal. Las microvellosidades son prolongaciones digitiformes de la membrana celular, que incrementan considerablemente la superficie de absorción de las células que tapizan la superficie interna de la mucosa del intestino delgado (TEM).

está limitado por su tasa de difusión, que depende del tamaño. Dado que la tasa de difusión es inversamente proporcional al tamaño de la molécula, esta limitación es más significativa en las macromoléculas, como las proteínas o los ácidos nucleicos. Algunas células de organismos superiores superan, en cierta medida, esta limitación, gracias a las **corrientes citoplásmicas** (llamadas **ciclosis** en células vegetales), un proceso que supone el movimiento activo del citoplasma. Sin embargo, casi siempre el tamaño de una célula está limitado por las tasas de difusión de las moléculas que contiene.

La necesidad de concentraciones adecuadas de reactivos y catalizadores. El tercer límite al tamaño celular está determinado por la necesidad de mantener la concentración adecuada de los compuestos esenciales y los catalizadores (enzimas) que intervienen en los procesos que la célula debe llevar a cabo. Para que tenga lugar una reacción química en una célula, los reactivos apropiados tienen que colisionar con y unirse a la superficie de una enzima determinada. La frecuencia con la cual se producen esas colisiones aleatorias, crece al aumentar las concentraciones de los reactivos y la propia enzima. Para mantener los niveles apropiados en una célula que duplique su tamaño, el número de estas moléculas debe multiplicarse por ocho. Ese incremento grava, obviamente, las capacidades sintéticas de la célula.

Las células eucariontes se valen de orgánulos para compartimentar sus funciones

Una solución eficaz para los problemas de concentración consiste en la *compartimentación de actividades* en regiones específicas de la célula. Si todas las enzimas y compuestos necesarios para un proceso particular se localizan en una determinada región, sólo se requiere una alta concentración de esas sustancias en la mencionada región y no en el resto de la célula.

Para compartimentar actividades, la mayoría de las células eucariontes tienen **órganulos**, que son compartimientos rodeados de membrana, especializados en funciones específicas. Por ejemplo, las células de la hoja de un vegetal contienen la mayoría de las enzimas, compuestos y pigmentos necesarios para la fotosíntesis, localizados en unas estructuras denominadas *cloroplastos*. Estas células pueden, por tanto, mantener la concentración apropiada de todo lo necesario para la fotosíntesis dentro del cloroplasto, sin necesidad de que estas sustancias aparezcan en otros lugares. De manera análoga, otras funciones se localizan en otros compartimientos celulares. La compartimentación de funciones específicas permite a las grandes células animales y vegetales mantener concentraciones locales altas de enzimas y compuestos necesarios para los procesos celulares. Así, estos procesos pueden desarrollarse de forma eficaz, incluso en estas células que son varios órdenes de magnitud mayores que las bacterias.

Los procariotas y las eucariotas difieren entre sí en múltiples aspectos

Volviendo a la distinción básica entre procariotas y eucariotas, se conocen muchas diferencias estructurales, bioquímicas y genéticas entre las eubacterias y las arqueas, por una parte, y las células eucariontes, por otra. Algunas de esas diferencias se resumen en la Tabla 4.1 y se discuten aquí brevemente.

Presencia o ausencia de un núcleo rodeado de membrana. Como ya se ha señalado, la diferencia principal entre eucariotas y procariotas es un reflejo de su propia nomenclatura: los organismos eucariotas tienen un núcleo auténtico, rodeado de membrana, mientras que los procariotas, no. En lugar de estar encerrada por una membrana, la información genética de las células procariontes está localizada en una región del citoplasma denominada *nucleoide* (Figura 4.3). En las células eucariontes, la mayoría de la información genética se localiza en el núcleo, que está rodeado, no por una simple membrana, sino por una *envuelta nuclear* consistente en dos membranas (Figura 4.4). Otras características estructurales del núcleo son el *nucleolo*, el lugar de la síntesis de ribosomas y los *cromosomas*, que portan el DNA y que se dispersan en forma de cromatina por todo el *nucleoplasma* que ocupa el interior del núcleo.

Tabla 4.1 Parecidos y diferencias entre células procariontes y eucariontes

Propiedad	Células procariontes (eubacterias y arqueas)	Eucariontes
Tamaño*	Pequeño (en la mayoría de los casos unos pocos micrómetros de longitud o diámetro)	Grande (en la mayoría de los casos 10-50 veces longitud o el diámetro de los procariotas)
Núcleo rodeado de membrana	No	Sí
Orgánulos	No	Sí
Microtúbulos	No	Sí
Microfilamentos	No	Sí
Filamentos intermedios	No	Sí
Exocitosis y endocitosis	No	Sí
Modo de división celular	Fisión celular	Mitosis y meiosis
Información genética	DNA unido a unas pocas proteínas	DNA unido a proteínas (destacando las histonas) con las que forman los cromosomas
Procesamiento del RNA	Pequeño	Múltiple
Ribosomas**	Pequeño (70S); 3 moléculas de RNA y 55 proteínas	Grande (80S); 4 moléculas de RNA y unas 78 proteínas

* La disparidad de tamaño entre células procariontes y eucariontes indicada aquí es válida, en términos generales, si bien hay una gran variabilidad en ambos tipos celulares, pudiendo haber solapamientos en los rangos de tamaños.
** Los ribosomas se caracterizan por sus coeficientes de sedimentación o valores S, una medida de su tasa de sedimentación, basada en la forma y el tamaño. Los coeficientes de sedimentación se miden normalmente en unidades Svedberg (S), donde $1S = 1 \times 10^{-13}$ sec. A diferencia de los pesos moleculares, los valores S no son aditivos.

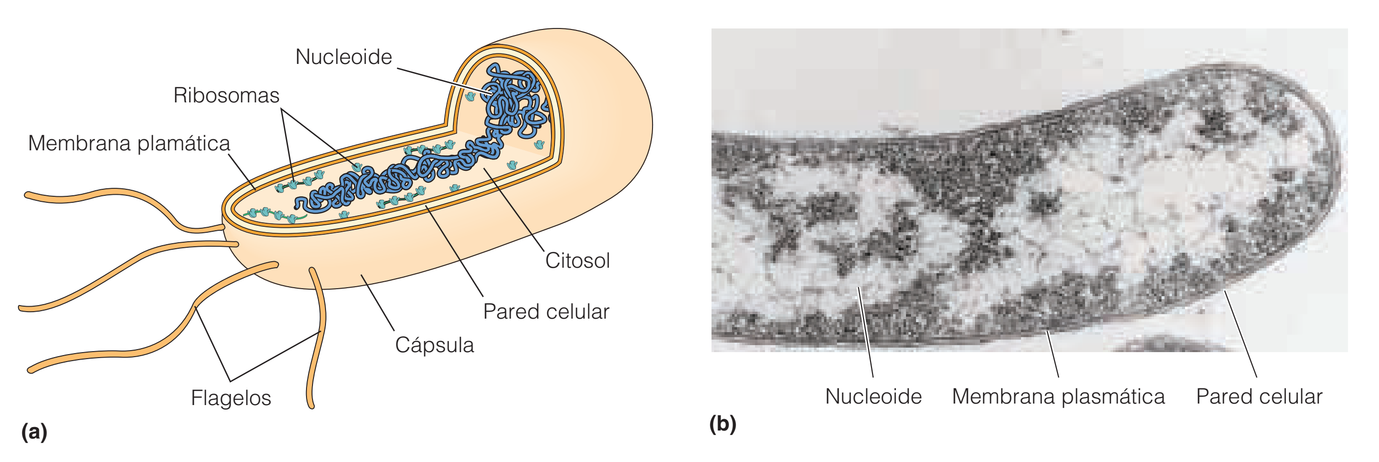


Figura 4.3 Estructura de una bacteria tipo. (**a**) Modelo tridimensional de una bacteria típica. (**b**) Micrografía electrónica de una célula bacteriana, donde se señalan varios de los elementos del esquema. Obsérvese que el nucleoide es, simplemente, un área dentro de la célula, no un orgánulo rodeado de membrana (TEM).

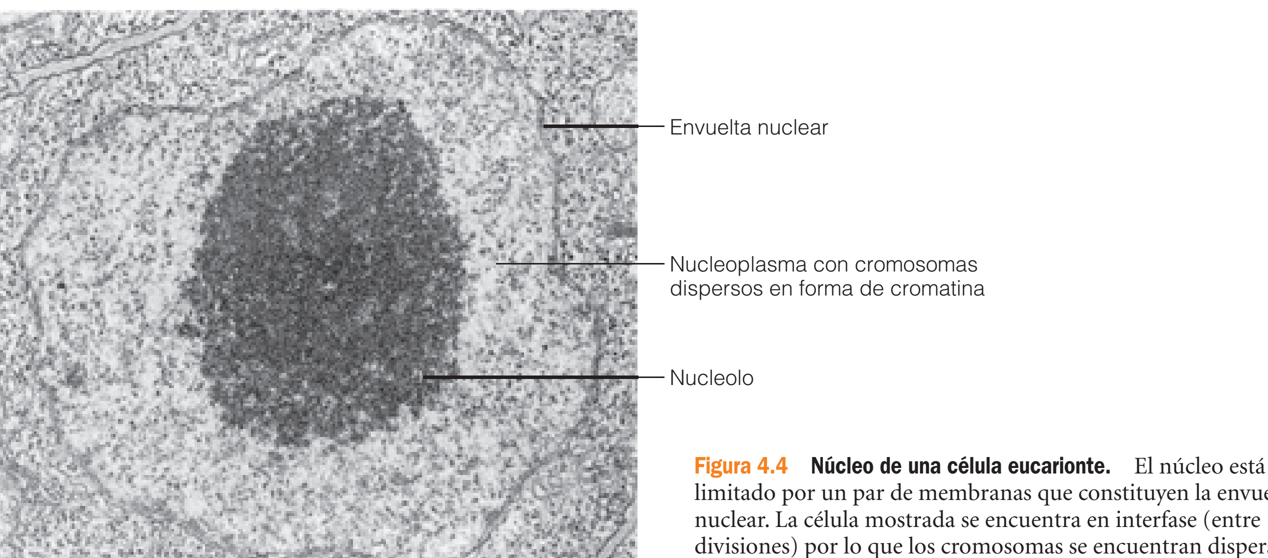


Figura 4.4 Núcleo de una célula eucarionte. El núcleo está limitado por un par de membranas que constituyen la envuelta nuclear. La célula mostrada se encuentra en interfase (entre divisiones) por lo que los cromosomas se encuentran dispersos, en forma de cromatina, en el nucleoplasma. El nucleolo es una estructura propia del núcleo, implicada en la síntesis de constituyentes ribosómicos (TEM).

El uso de membranas internas para segregar funciones. Como ilustra la Figura 4.3, las células procariontes tienen muy pocas membranas internas; la mayoría de las funciones celulares ocurren en el citoplasma o en la membrana plasmática. Por contra, las células eucariontes hacen un uso generalizado de las membranas internas para limitar funciones específicas (Figuras 4.5 y 4.6).

Como ejemplos de sistemas de membrana internos en células eucariontes están el retículo endoplásmico, el complejo de Golgi y las membranas que rodean y delimitan a órganulos como las mitocondrias, los cloroplastos, los lisosomas y los peroxisomas, así como varios tipos de vacuolas y vesículas. Cada uno de estos órganulos tiene su propia membrana (o par de membranas, en el caso de mitocon-

Poro nuclear
Vacuola
Envuelta nuclear
Nucleolo
Núcleo
Ribosomas libres
Mitocondrias
Lisosomas
Centriolos
Réticulo endoplásmico rugoso
Membrana plasmática
Réticulo endoplásmico liso
Peroxisoma
Citosol
Complejo de Golgi
(a)
(b)
2,5 μm

Figura 4.5 Célula animal tipo. (**a**) Dibujo esquemático de una célula animal en la que se puede apreciar la forma y tamaño de los orgánulos y otras estructuras subcelulares. (**b**) Célula plasmática (un tipo de glóbulo blanco), con varias estructuras etiquetadas (TEM).

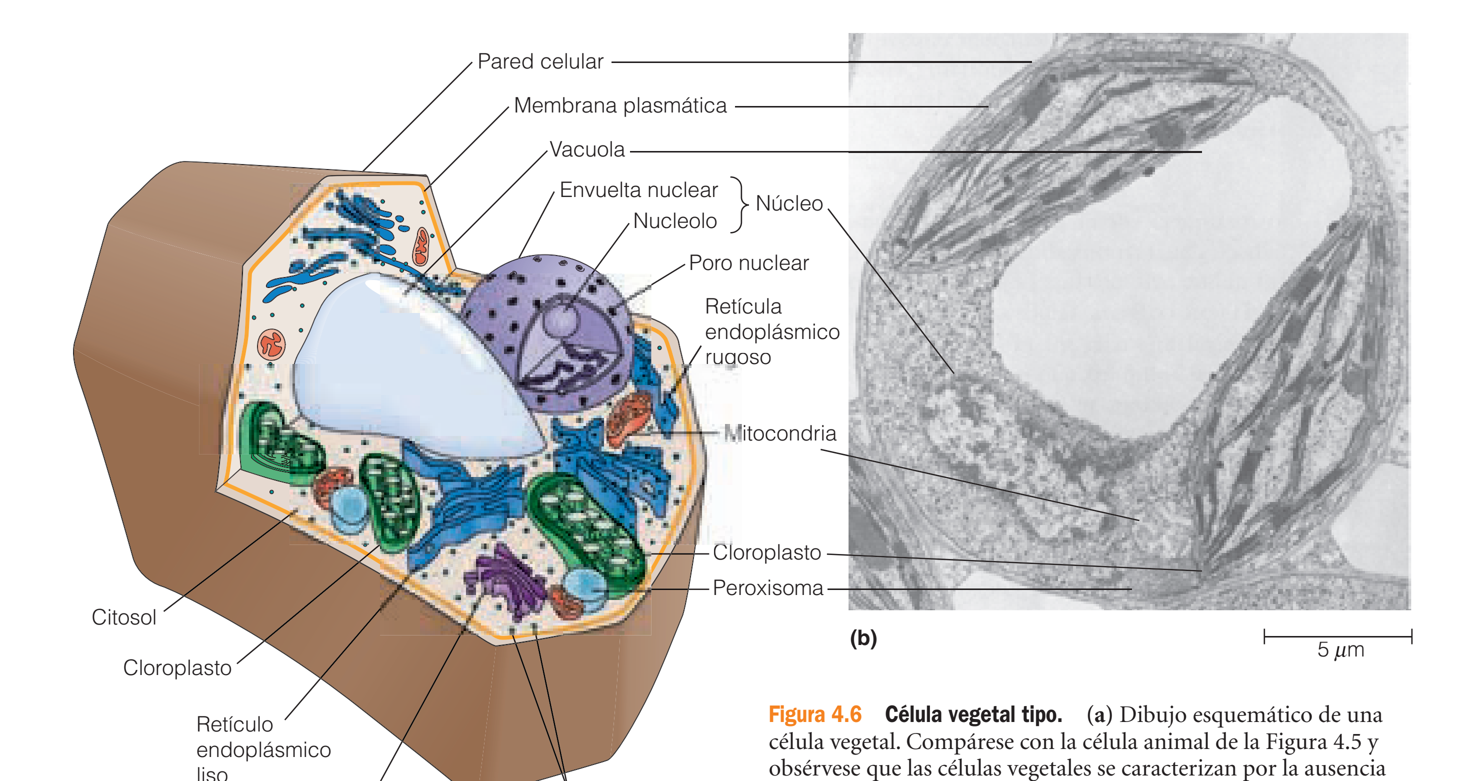


Figura 4.6 Célula vegetal tipo. (**a**) Dibujo esquemático de una célula vegetal. Compárese con la célula animal de la Figura 4.5 y obsérvese que las células vegetales se caracterizan por la ausencia de lisosomas y presencia de cloroplastos, pared celular y vacuolas voluminosas. (**b**) Célula foliar de *Coleus*, con varias estructuras celulares identificadas.

drias y cloroplastos), similar a otras membranas en su estructura básica, pero a menudo con una composición química y proteica específicas. Dentro de cada órganulo se encuentra la maquinaria molecular necesaria para llevar a cabo las funciones celulares específicas para las que se ha especializado la estructura. Vamos a ir encontrándonos a estos órganulos a lo largo de este tema y volveremos a cada uno de ellos, en su contexto apropiado, en sucesivos capítulos.

Túbulos y filamentos. En el citoplasma de las células eucariontes hay también varias estructuras no membranosas, que están implicadas en la movilidad y contracción celular y en el establecimiento y soporte de la arquitectura celular. Éstas son los *microtúbulos* de los cilios y flagelos, presentes en muchas células, los *microfilamentos* de actina, presentes en las fibrillas musculares y en otras estructuras implicadas en movimientos y los *filamentos intermedios*, que son especialmente prominentes en células sometidas a tensión. Los microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios son componentes esenciales del citoesqueleto, que confiere forma y elasticidad a la mayoría de las células eucariontes, como aprenderemos detalladamente en el Capítulo 15. Estas estructuras, al igual que los ribosomas, son ejemplos de órganulos sin membrana.

Exocitosis y endocitosis. Otra de las características de las células eucariontes es su habilidad para intercambiar materiales entre los compartimientos intracelulares rodeados de membrana y el exterior de la célula. Dicho intercambio es posible por los procesos de *exocitosis* y *endocitosis*, que son exclusivos de las células eucariontes. Durante la endocitosis, se invaginan porciones pequeñas de la membrana plasmática, de la cual se separan para formar vesículas citoplásmicas, que contienen sustancias que previamente estaban en el exterior. La exocitosis es, esencialmente, el proceso inverso: las vesículas rodeadas de membrana del interior celular se fusionan con la membrana plasmática, liberando su contenido hacia el exterior.

Organización del DNA. La cantidad y forma de organización del material genético es una diferencia más entre células procariontes y eucariontes. Los procariotas contienen cantidades de DNA que podríamos definir como «razonables»; es decir, conocemos la mayor parte de su DNA, en términos que hacen referencia al mapeo de áreas que codifican proteínas. El DNA procarionte está, habitualmente, presente en la célula, como una o más moléculas circulares, asociadas con relativamente pocas proteínas.

Aunque de tamaño razonable en términos genéticos, la molécula del DNA circular de una célula procarionte es mucho más larga que la propia célula. Esto implica que tiene que plegarse y empaquetarse densamente para caber en el nucleoide de la célula. Por ejemplo, la bacteria intestinal *Escherichia coli* tiene sólo uno o dos micrómetros de longi-

tud, si bien su molécula de DNA circular mide 1.300 μm de perímetro. Está claro que se necesita mucho plegamiento y empaquetamiento para encajar tanto DNA en una región tan diminuta de una célula tan pequeña. Es como introducir 18 m de hilo en un dedal.

Pero si el empaquetamiento del DNA en una célula procarionte, parece problemático ¡qué no será en una eucarionte! Aunque algunos de los eucariotas menos evolucionados (como las levaduras y las moscas de la fruta) tienen sólo de 10 a 50 veces más DNA que las bacterias, la mayoría de las células eucariontes tienen, como mínimo, 1.000 veces más DNA que *E. coli.* Es tentador etiquetar a tales cantidades de DNA como «no razonables», puesto que en la actualidad, no podemos asignar funciones a la mayor parte de él. Pero esto, claro, es una apreciación más propia de los biólogos celulares que de la propia célula.

Cualquiera que sea la función genética de tales cantidades de DNA, el problema del empaquetamiento es serio. Las células eucariontes lo resuelven organizando el DNA en estructuras complejas llamadas **cromosomas**, que contienen, como mínimo, tantas proteínas como DNA. En esa forma de cromosoma, el DNA de las células eucariontes se empaqueta, se segrega durante la división celular, se transmite a las células hijas y se transcribe, cuando se necesita (en forma de moléculas de RNA, implicadas en la síntesis de proteínas). En la Figura 4.7 se muestra un cromosoma de una célula animal visto con el microscopio electrónico de alto voltaje.

Segregación de la información genética. Otra diferencia notoria entre procariotas y eucariotas es la forma en la cual distribuye la información genética a las células hijas, durante la división. Las células procariontes simplemente replican su DNA y se dividen en un proceso relativamente simple, denominado *fisión celular*, cuyo resultado es que cada célula hija recibe una molécula de DNA. Las células eucariontes también replican su DNA, pero para distribuir equitativamente sus cromosomas a las células hijas se sirven de dos procesos más complejos, denominados *mitosis* y *meiosis.* El cromosoma de la Figura 4.7 se obtuvo de una célula que estaba en mitosis. Si no se hubiera interrumpido el proceso de división, el cromosoma se habría repartido en dos cromosomas hijos, destinados cada uno de ellos a cada célula hija.

Expresión del DNA. Las diferencias entre células procariontes y eucariontes se extienden a la expresión de la información genética. Las células eucariontes tienden a transcribir esta información en forma de moléculas grandes de RNA nuclear, que luego se procesa y transporta para alcanzar el citoplasma en su tamaño apropiado, donde dirigirá la síntesis de proteínas.

Por contra, las células procariontes transcriben segmentos específicos de información genética en RNAs mensajeros, cuyo procesamiento es nulo o mínimo. De hecho,

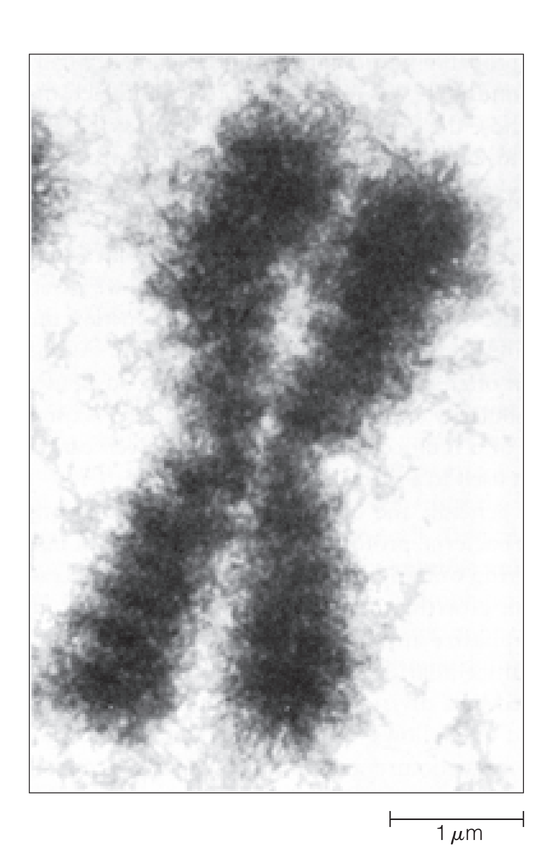


Figura 4.7 Cromosoma eucarionte. Cromosoma obtenido de una célula de hámster en cultivo, observado con el microscopio electrónico de alto voltaje (HVEM). La célula se encontraba en mitosis, por lo que el cromosoma aparece muy condensado. Si se hubiera permitido que progresara la mitosis, el cromosoma se habría dividido en dos, dirigiéndose una parte a cada célula hija.

la ausencia de una membrana nuclear, permite que las moléculas nuevas de RNA puedan iniciar la traducción de proteínas incluso antes de que se complete su propia síntesis (Figura 4.8). Las células procariontes difieren también en el tamaño y composición de los ribosomas empleados para sintetizar proteínas (*véase* Tabla 4.1). Volveremos a considerar esta diferencia más adelante en este mismo capítulo.

La especialización celular demuestra la unidad y la diversidad de la biología

En términos de estructura y función, las células se caracterizan, tanto por la unidad, como por la diversidad, como se ve en las células animales y vegetales típicas de las Figuras 4.5 y 4.6. Con unidad y diversidad, queremos decir que todas las células se parecen en lo fundamental, si bien pueden diferir considerablemente en otros aspectos importantes. En los próximos capítulos, nos centraremos en aspectos de estructura y función comunes a la mayoría de los tipos celulares. Veremos, por ejemplo, que prácticamente todas las células oxidan azúcares para obtener energía, transportan iones a través de la membrana, transcriben el RNA a partir

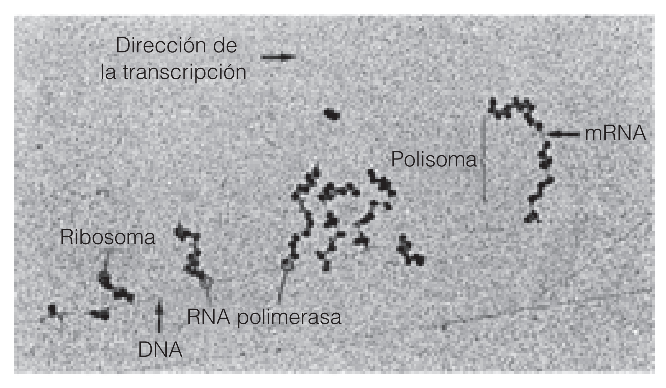


Figura 4.8 Expresión de la información genética en una célula procarionte. Esta micrografía electrónica muestra fragmentos pequeños del DNA de una célula bacteriana, uno de los cuales está siendo transcrito en RNA mensajero (mRNA), por la enzima RNA polimerasa. Los ribosomas se asocian a la molécula del mRNA, comenzando la síntesis de proteínas antes incluso de que se complete la transcripción del mensajero. Las formaciones denominadas polisomas están constituidas por el conjunto de ribosomas que se asocian a un mismo mRNA (TEM).

del DNA y se dividen para generar células hijas. Éstas son, por tanto, actividades de interés general para nosotros.

Lo mismo ocurre hablando en términos de características estructurales. Todas las células están rodeadas por una membrana de permeabilidad selectiva, todas utilizan ribosomas para la síntesis de proteínas y la mayoría contienen DNA de doble cadena como elemento de información genética. Así pues, podemos confiar en que los aspectos fundamentales de organización y función celulares, son comunes a la mayoría, si no a todas, las células.

Pero a veces, nuestro conocimiento de la biología celular mejora con la consideración, no solamente de la unidad, sino precisamente de la diversidad —no las características comunes a la mayoría de las células, sino aquellas que son especialmente prominentes en un tipo de célula particular—. Por ejemplo, para entender cómo funciona la secreción de proteínas, es obviamente ventajosa, la consideración de una célula especializada en esta función. Las células del páncreas humano serían una buena elección, porque segregan grandes cantidades de enzimas digestivas, como la amilasa y la tripsina.

De igual manera, para estudiar las funciones que sabemos que ocurren en las mitocondrias, sería, claramente ventajoso, elegir un tipo celular que estuviera especializado en los procesos de liberación de energía, que tienen lugar en estos orgánulos. Previsiblemente, este tipo celular tendrá muchas mitocondrias bien desarrolladas y activas. Precisamente por esto, Hans Krebs eligió los músculos del vuelo de las palomas como tejido en el cual llevar a cabo sus experimentos clásicos de la ruta oxidativa cíclica, que hoy día conocemos como el *ciclo del ácido tricarboxílico (TCA)*, o *ciclo de Krebs*.

Cada vez que profundizamos en las funciones de tipos celulares determinados para estudiar una función particular, estamos demostrando la diversidad de estructura y función debidas a la especialización celular. Aunque a menudo no nos damos cuenta de ello, también nos aprovechamos de la multicelularidad de muchos organismos, pues es en este entorno en el que una célula es capaz de comprometerse en una función especializada. En términos generales, los organismos unicelulares como las eubacterias, las arqueas, los protozoos y ciertas algas, son capaces de cubrir todas las funciones necesarias para la supervivencia, crecimiento y reproducción y no pueden especializarse en una función particular, a expensas de otras. Sin embargo, los organismos pluricelulares se caracterizan por la división de tareas en órganos y tejidos, que no sólo permite, sino que es necesaria para la especialización de estructura y función. Un grupo de células se especializa en una tarea, convirtiéndose ésta en su papel dentro de la economía del organismo.

Panorámica de las células eucariontes: cuadros de una exposición

De la discusión precedente, puede concluirse que todas las células llevan a cabo una serie de funciones básicas y tienen ciertas características estructurales comunes. Sin embargo, las células eucariontes son bastante más complicadas, estructuralmente, que las células procariontes, sobre todo porque aquéllas compartimentalizan varias funciones en orgánulos y otras estructuras intracelulares. La complejidad estructural de las células eucariontes se ilustra en las células animales y vegetales típicas mostradas en las Figuras 4.5 y 4.6.

En realidad, no existe una auténtica célula «tipo»; todas las células eucariontes exhiben características que las diferencian de las células de las Figuras 4.5 y 4.6. Pese a todo, la mayoría de las células eucariontes son bastante parecidas, garantizándose que pueden responder a unas características estructurales comunes.

Como se ha señalado, una célula eucarionte típica tiene, por lo menos, cuatro identificadores estructurales: una *membrana plasmática* (o *celular*), que define su contorno y limita su contenido, un *núcleo*, que alberga el DNA que dirige la actividad celular, unos *orgánulos de membrana*, en los que se verifican varias funciones celulares y un citosol salpicado por túbulos y filamentos. Además, las células vegetales tienen una *pared celular* rígida por fuera de la membrana plasmática. Las células animales no tienen pared, si bien suelen rodearse de una matriz extracelular, formada básicamente por colágeno y unas proteínas especiales llamadas proteoglicanos.

Nuestro propósito aquí es tener un primer contacto con la arquitectura celular. No estamos aún preparados

para considerar estas características en detalle; eso tendrá que esperar a los próximos capítulos, cuando analicemos los procesos celulares en los que están implicados los diferentes orgánulos y otras estructuras. Por ahora echemos un vistazo, como quien mira los cuadros de una exposición. Nos desplazaremos por la galería con relativa rapidez, para tener una primera impresión y con la intención de volver más tarde a cada estructura, para realizar un examen más detallado (si está interesado en más información con relación a un aspecto determinado, vea la Tabla 4.2, en la que se especifican los capítulos en los que se consideran las estructuras celulares y las técnicas de investigación apropiadas).

Tabla 4.2 Referencias cruzadas de estructuras celulares y técnicas empleadas para su estudio

La información detallada respecto de estas estructuras celulares, se encuentra en los siguientes capítulos:	
Pared celular	Capítulo 17
Cloroplasto	Capítulo 11
Citoesqueleto	Capítulo 15
Retículo endoplásmico	Capítulo 12
Matriz extracelular	Capítulo 17
Aparato de Golgi	Capítulo 12
Lisosoma	Capítulo 12
Mitocondria	Capítulo 10
Núcleo	Capítulo 18
Peroxisoma	Capítulo 12
Membrana plasmática	Capítulo 7
Ribosoma	Capítulo 22
La información detallada acerca de las técnicas usadas para el estudio de las estructuras celulares, se encuentra en los capítulos y apéndice:	
Autorradiografía	Capítulo18 y Apéndice
Centrifugación diferencial	Capítulo 12
Microscopía electrónica	Apéndice
Centrifugación en equilibrio de densidad	Capítulo 12
Microscopía óptica	Apéndice

La membrana plasmática define los límites celulares y confina los contenidos

Nuestro periplo comienza con la **membrana plasmática**, que rodea a cada célula (Figura 4.9a). La membrana plasmática define los límites de la célula y asegura la retención de su contenido. Como todas las membranas celulares, la membrana plasmática está formada por fosfolípidos, otros lípidos y proteínas y se organiza en dos capas (Figura 4.9b). Cada molécula de fosfolípido consiste en dos «colas» hidrófobas y una «cabeza» hidrófila, siendo, por tanto, una *molécula anfipática* (*véase* Figuras 2.11 y 2.12).

Los fosfolípidos se orientan en la bicapa de manera que las colas de cada molécula (las cadenas hidrocarbonadas apolares de los ácidos grasos) miren hacia el interior. La cabeza hidrófila (la que contiene el grupo fosfato, cargado negativamente y el grupo amino, cargado positivamente) mira hacia el exterior, bien sea hacia fuera, o hacia dentro de la célula, dependiendo de en cuál de los estratos de la bicapa se localiza el lípido (Figura 4.9c). La bicapa lipídica es la unidad estructural básica de todas las membranas y sirve como una barrera de permeabilidad para la mayoría de las sustancias hidrosolubles. Vista con el microscopio electrónico, la bicapa aparece como un par de bandas densas (*véase* Figura 2.13a).

Las proteínas de la membrana también son anfipáticas, con regiones hidrófobas e hidrófilas en su superficie. Se orientan en la membrana de forma que las regiones hidrófobas se localizan hacia el interior, mientras que las regiones hidrófilas se proyectan hacia el medio acuoso en la superficie de la membrana. Muchas de las proteínas con regiones hidrófilas expuestas hacia el medio externo, presentan unidas cadenas laterales de oligosacáridos (hidratos de carbono cortos), por lo que se denominan *glicoproteínas* (Figura 4.9c).

Las proteínas presentes en la membrana plasmática desempeñan múltiples funciones. Algunas son *enzimas*, que realizan reacciones que tienen lugar en la propia membrana. Otras sirven como puntos de *anclaje* a elementos del citoesqueleto, como veremos más tarde en este capítulo. Otras son *proteínas transportadoras*, responsables del intercambio de sustancias específicas (generalmente iones y solutos hidrófilos) a través de la membrana. También entre las proteínas de membrana se encuentran los *receptores* de señales químicas, que actuando desde el exterior desencadenan respuestas intracelulares específicas. Las proteínas de transporte y los receptores (así como muchas otras proteínas de membrana) son proteínas transmembranales, con regiones hidrófilas asomando a ambos lados y conectadas por uno o más dominios hidrófobos insertados en la membrana.

El núcleo es el centro de información celular

Si viajamos ahora hacia el interior de la célula, una de las estructuras más prominentes con las cuales nos vamos a la encontrar, es el **núcleo** (Figura 4.10). El núcleo es el centro de información de la célula. Aquí se encuentra el DNA de los *cromosomas*, separado del resto de la célula por una membrana. En realidad, el límite alrededor del núcleo está formado por dos membranas, llamadas *membrana nuclear externa* e *interna*. Consideradas en su conjunto, las dos membranas forman la **envuelta nuclear**. Un rasgo exclusivo de las membranas de la envuelta nuclear es la presencia de numerosas aberturas de pequeño tamaño, denominadas *poros* (Figura 4.10b y c). Cada poro es un canal a través del cual se intercambian moléculas hidrosolubles entre el núcleo y el citoplasma. Se supone que a través de esos poros pasan ribosomas, RNAs mensajeros, proteínas cromosómicas y enzimas necesarias para la actividad nuclear.

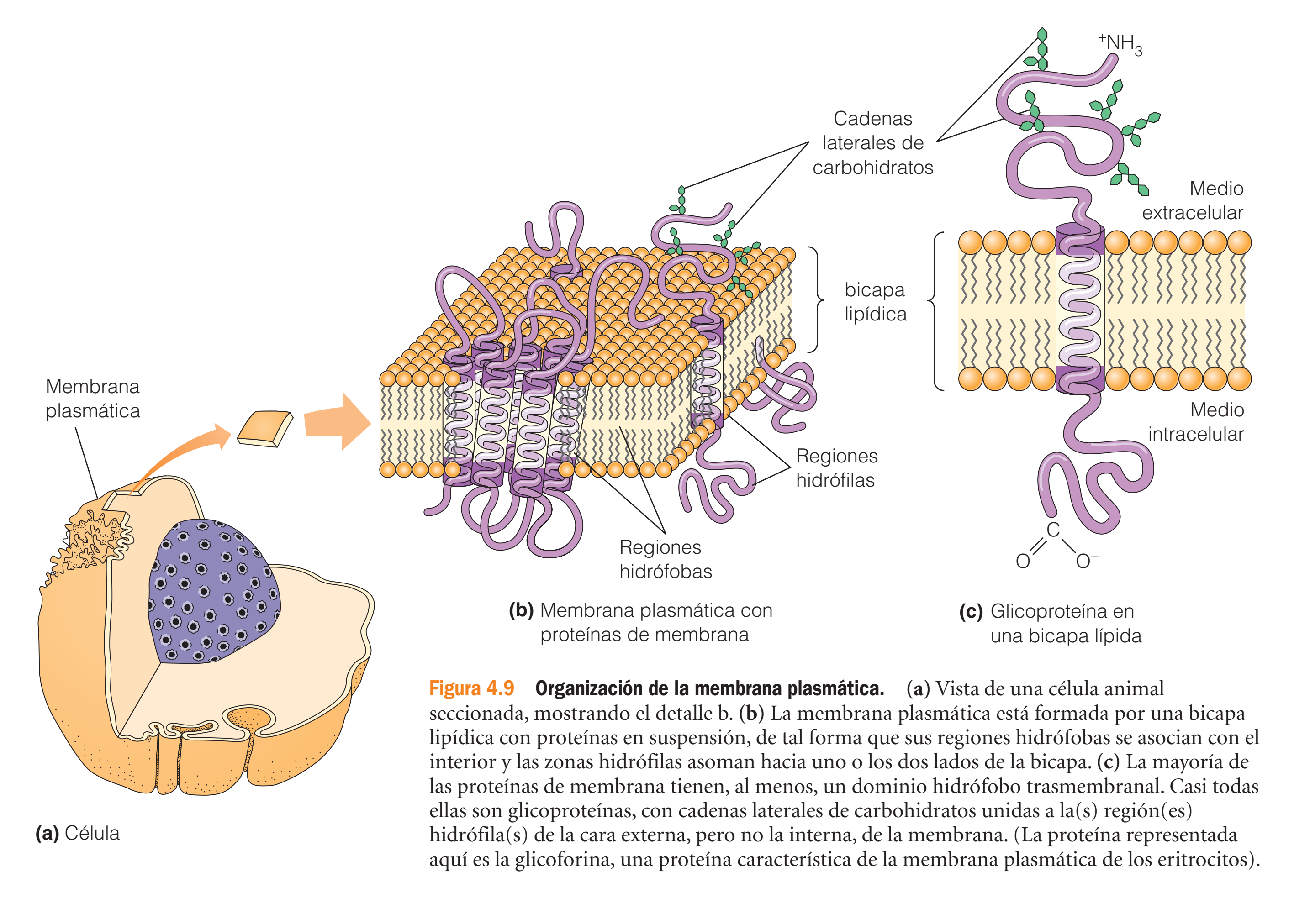


Figura 4.9 Organización de la membrana plasmática. (**a**) Vista de una célula animal seccionada, mostrando el detalle b. (**b**) La membrana plasmática está formada por una bicapa lipídica con proteínas en suspensión, de tal forma que sus regiones hidrófobas se asocian con el interior y las zonas hidrófilas asoman hacia uno o los dos lados de la bicapa. (**c**) La mayoría de las proteínas de membrana tienen, al menos, un dominio hidrófobo trasmembranal. Casi todas ellas son glicoproteínas, con cadenas laterales de carbohidratos unidas a la(s) región(es) hidrófila(s) de la cara externa, pero no la interna, de la membrana. (La proteína representada aquí es la glicoforina, una proteína característica de la membrana plasmática de los eritrocitos).

El número de cromosomas en el núcleo es característico de cada especie. Puede ser tan bajo como dos (por ejemplo, en los espermatozoides y ovocitos de los saltamontes) o alcanzar varios centenares. Los cromosomas son más fácilmente visibles durante la mitosis, cuando están muy condensados y se tiñen intensamente (*véase* Figura 4.7). Durante la *interfase* los cromosomas se dispersan en forma de **cromatina**, constituida por DNA y proteínas, que no es tan fácil de visualizar (*véase* Figura 4.10b).

En el núcleo aparece también el **nucleolo**, estructura responsable de la síntesis y ensamblaje de la mayoría del RNA y proteínas necesarios para formar las subunidades de los ribosomas. Los nucleolos están generalmente asociados con regiones específicas de ciertos cromosomas.

Las membranas intracelulares y los orgánulos definen compartimientos

El contenido de la célula excluyendo el núcleo se denomina *citoplasma* y está ocupado por los *órganulos* y por el medio semifluido en el cual están suspendidos, que es el *citosol.* En esta sección, consideraremos cada uno de los principales órganulos de las células eucariontes. En una célula animal típica, esos compartimientos constituyen casi la mitad del volumen interno celular.

A medida que continuamos nuestro periplo por la célula eucarionte y empezamos a explorar sus órganulos, quizá encuentre usted útil consultar el Anexo 4A, en el que se exponen una serie de patologías humanas hereditarias asociadas a diferentes orgánulos. En la mayoría de los casos, estas alteraciones están causadas por defectos genéticos en proteínas —casi siempre enzimas y proteínas de transporte— propias del órganulo en particular.

La mitocondria. El estudio de los orgánulos eucariontes, comienza con la **mitocondria**. La estructura de la mitocondria se muestra en la Figura 4.11. Las mitocondrias son grandes, para los estándares celulares —hasta 1 μm de anchura y varios micrómetros de longitud—. Una mitocondria es, por tanto, comparable en tamaño, a una bacteria completa. El hecho de que la mayoría de las células eucariontes tienen varios centenares de mitocondrias, cada una de ellas de un tamaño aproximado al de una bacteria, enfatiza de nuevo la gran diferencia de talla entre las células eucariontes y procariontes. La mitocondria está encerrada por dos membranas, denominadas *membrana interna* y *membrana externa.*

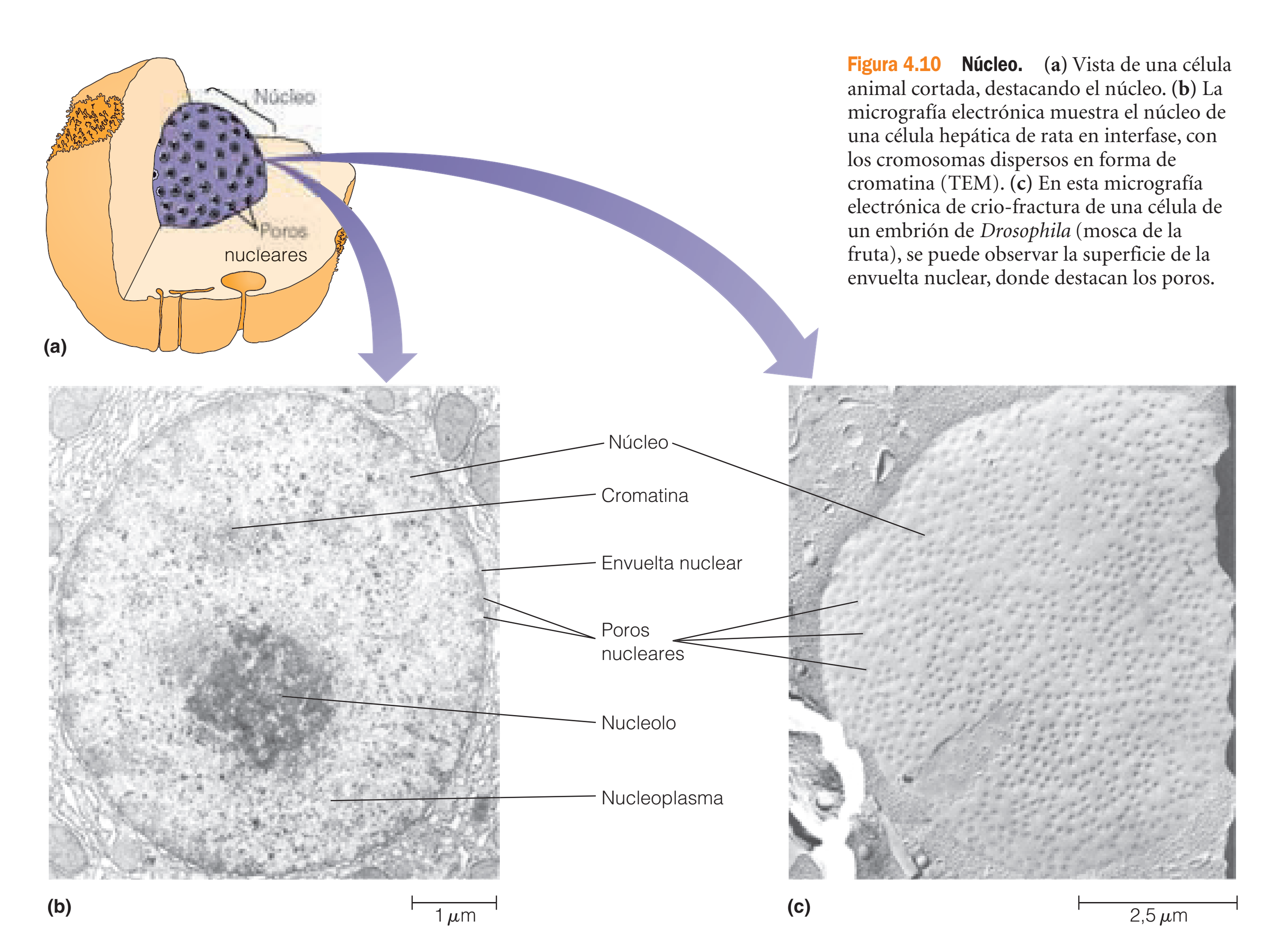


Figura 4.10 Núcleo. (**a**) Vista de una célula animal cortada, destacando el núcleo. (**b**) La micrografía electrónica muestra el núcleo de una célula hepática de rata en interfase, con los cromosomas dispersos en forma de cromatina (TEM). (**c**) En esta micrografía electrónica de crio-fractura de una célula de un embrión de *Drosophila* (mosca de la fruta), se puede observar la superficie de la envuelta nuclear, donde destacan los poros.

La mayoría de las reacciones químicas implicadas en la oxidación de azúcares y de otros «combustibles» moleculares de la célula, tienen lugar dentro de la mitocondria. El fin de estos procesos es obtener energía de los alimentos y conservar cuanta sea posible en la forma del compuesto de alta energía *adenosina trifosfato (ATP)*. Es precisamente en la mitocondria, donde la célula almacena la mayoría de las enzimas y metabolitos implicados en procesos celulares tan importantes como el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), la oxidación de grasas y la generación de ATP. La mayoría de los intermediarios implicados en el transporte de electrones desde las moléculas oxidables de los alimentos hasta el oxígeno, están localizados dentro o en la superficie de las **crestas**, que son repliegues de la membrana mitocondrial interna. Otras reacciones, como las del TCA y las de la oxidación de grasas, tienen lugar en la **matriz** semifluida que llena el interior de la mitocondria.

El número y localización de las mitocondrias de una célula está en relación con su papel en dicha célula. Los tejidos con requerimientos elevados de ATP como fuente de energía, están bien dotados de mitocondrias, que se localizan, precisamente, en los lugares donde las necesidades energéticas son mayores. Esto queda bien ilustrado en el caso del espermatozoide de la Figura 4.12. Como se ve en el dibujo, el espermatozoide tiene una sola mitocondria espiral, dispuesta alrededor de un eje central de la célula o *axonema.* Obsérvese cómo la mitocondria se enrolla estrechamente alrededor del axonema, justamente donde el ATP es necesario para la propulsión del espermatozoide. Las células musculares y las especializadas en el transporte de iones tienen también muchas mitocondrias, que se localizan estratégicamente en los lugares donde se requiere energía (Figura 4.3).

Aunque la estructura de las mitocondrias se ilustra casi siempre en secciones transversales, como la de la Figura 4.11, las imágenes de mitocondrias en células vivas con métodos fluorescentes, demuestran que son muy largas y altamente ramificadas. Este tipo de estructura está más extendida que la de la mitocondria del segmento central del espermatozoide y, de hecho, es más representativa de la forma y tamaño mitocondriales que las que aparecen en los esquemas convencionales.

El cloroplasto. El siguiente orgánulo que nos encontramos en nuestro paseo por la galería es el **cloroplasto**, que en muchos aspectos es un pariente próximo de la mitocon-

Orgánulos y enfermedades humanas

Aunque no solemos tenerlo en consideración —de hecho, la mayoría de las veces ni nos acordamos de ello— muchas enfermedades humanas están causadas por disfunciones moleculares en determinados órganulos. Muchos de los órganulos que nos hemos encontrado en nuestro paseo por la «exposición de pintura» de este capítulo —y que encontraremos con más detalle en capítulos sucesivos— son lugares en los que se pueden presentar diferentes alteraciones genéticas, la mayoría de las cuales son raras, pero muy severas. La lista de enfermedades asociadas a órganulos es larga e incluye alteraciones mitocondriales como las *miopatías* (enfermedades musculares) el *síndrome de Leigh* (una enfermedad neurodegenerativa devastadora) y *patologías infantiles respiratorias fatales.* Las alteraciones en los peroxisomas son también múltiples, como el *síndrome de Zellweger* y la *adrenoleucodistrofia neonatal*, y están también descritas más de 40 *enfermedades lisosomales de acumulación* caracterizadas por la acumulación nociva de determinadas sustancias. Consideraremos algunas de esas alteraciones, si bien sólo de una forma introductoria. De paso anticiparemos conceptos relacionados con la función de varios órganulos, incluyendo a las mitocondrias (Capítulo 10) y a los peroxisomas y lisosomas (Capítulo 12).

Alteraciones mitocondriales

La mayoría de las patologías debidas a defectos en las mitocondrias son típicas de los tejidos muscular y nervioso. Este hecho no sorprende, teniendo en cuenta la alta tasa de consumo de ATP que presentan estos tejidos y el papel fundamental la mitocondrias en la síntesis de ATP. La lista incluye, al menos, 35 miopatías y varias alteraciones que afectan a la función nerviosa. Según el tipo de defecto, la enfermedad puede ser más o menos grave. Algunas son letales durante la infancia; otras producen ceguera, sordera, convulsiones o infartos cerebrales. Las manifestaciones leves, por otra parte, se caracterizan por atonía muscular, intolerancia al ejercicio, deterioro muscular y, en algunos casos, infertilidad debida a la ausencia de motilidad espermática.

Todas éstas son alteraciones genéticas y para comprenderlas debemos saber que la mitocondria tiene su propio DNA, como veremos en los Capítulos 10 y 18. La mitocondria codifica algunas, pero ni mucho menos la mayoría, de sus proteínas. El DNA mitocondrial humano (mtDNA) contiene 37 genes, de los cuales 22 especifican RNAs de transferencia (tRNAs) y dos RNAs ribosómicos (rRNAs). Los 13 genes restantes codifican polipéptidos, todos ellos pertenecientes a los *complejos respiratorios* que permiten la síntesis de ATP dependiente de oxígeno. (Para conocer más detalles de este proceso, véase la Figura 10.15 de la p. 298).

Aunque los complejos respiratorios están además integrados por unos 70 polipéptidos codificados por el DNA nuclear, la mayoría de las miopatías mitocondriales son debidas a alteraciones en el DNA de la mitocondria, consistentes en deleciones o mutaciones. La mayoría de estos defectos afectan a genes que codifican tRNAs mitocondriales, los cuales son imprescindibles para la síntesis de los 13 polipéptidos sintetizados en la mitocondria. Como ejemplos están la *encefalomiopatía mitocondrial*, que afecta al cerebro y la dolencia cardíaca *cardiomiopatía hipertrófica*; ambas son debidas a alteraciones en los tRNAs de los aminoácidos leucina e isoleucina, respectivamente.

Las alteraciones mitocondriales siguen el patrón conocido como *herencia materna*, que significa que provienen exclusivamente de la madre. Las mitocondrias humanas derivan de las que estaban presentes en el óvulo en el momento de la fecundación; el espermatozoide aporta el genoma nuclear pero su contribución mitocondrial es nula o mínima. Otra distinción importante entre los genes nucleares y mitocondriales es que una célula humana típica tiene cientos de mitocondrias, cada una de ellas con dos a diez copias de mtDNA, por lo que la célula contiene miles de copias del mtDNA. El resultado es que los mtDNAs pueden ser bastante heterogéneos, con diferencias tisulares, por lo que las alteraciones mitocondriales tienden a presentarse sólo cuando la mayoría de las mitocondrias de un tejido determinado portan el gen mutante.

Alteraciones en los peroxisomas

La mayoría de las alteraciones relacionadas con los peroxisomas tienen su origen en la ausencia de una única proteína. Teniendo en cuenta la variedad de funciones que se verifican en este orgánulo, no es sorprendente que exista un gran número de patologías asociadas a la ausencia o modificación de proteínas del peroxisomas. A diferencia de las mitocondrias, los peroxisomas no contienen DNA; así pues, todos los defectos son debidos a mutaciones en genes del núcleo.

Tres de las patologías relacionadas con los peroxisomas mejor conocidas son el *síndrome de Zellweger (ZS)*, la *adrenoleucodistrofia neonatal (NALD)* y *la enfermedad infantil de Refsum (IRD).* El ZS se caracteriza por múltiples disfunciones neurológicas agudas, visuales y hepáticas, que conducen a la muerte durante la infancia. La NALD es una enfermedad ligada al sexo (exclusiva de varones), generalmente menos severa en su sintomatología que el ZS, pero finalmente cursa con alteraciones neurológicas graves y la muerte. Los niños afectados por NALD comienzan a mostrar síntomas durante la infancia temprana. Los síntomas de la IRD son similares pero menos agudos que los del ZS y la NALD.

Aunque estas patologías fueron descubiertas de forma independiente e inicialmente no se consideraron relacionadas, hoy día sabemos que cada una de estas alteraciones está acusada por mutaciones en alguno de 11 genes determinados. Las mutaciones más intensas de estos genes causan el ZS, las mutaciones no tan severas son el origen de la NALD y, por último, las más suaves son las responsables de la IRD.

En algunas formas de la NALD, el producto del gen deficiente es una proteína de la membrana del peroxisoma implicada en el transporte de ácidos grasos de cadena muy larga; éstos se fragmentan, dentro del peroxisoma, en cadenas más cortas que pueden ser luego procesadas en las mitocondrias. Cuando el transporte se bloquea o es deficiente, los ácidos grasos de cadena muy larga se acumulan en las células y los tejidos. Esta acumulación es particularmente devastadora en el cerebro, donde los ácidos grasos destruyen las vainas de mielina, que proveen de su aislamiento esencial a las células nerviosas. De esta manera, la transmisión de las señales nerviosas queda profundamente alterada.

En el ZS, el producto génico defectuoso o ausente es una cualquiera de las proteínas que son esenciales para que las enzimas del peroxisoma puedan ser importadas por dicho orgánulo. Como explicaremos en el Capítulo 12, las proteínas del peroxisoma están codificadas por genes nucleares, se sintetizan en los ribosomas del citoplasma y son luego importadas por el peroxisoma. Los pacientes afectados con el ZS son incapaces de sintetizar alguna de las proteínas implicadas en transporte de esas enzimas hacia el orgánulo. Éstas se acumulan en el citosol donde no pueden desempeñar sus funciones. Los peroxisomas están presentes en las células de esos individuos pero parecen orgánulos «fantasmas», estructuras rodeadas de membrana, pero sin el contenido enzimático normal. Como se indicó anteriormente los niños afectados desarrollan una variedad de alteraciones neurológicas, visuales y hepáticas que conducen invariablemente a la muerte durante la infancia temprana.

Enfermedades lisosomales

Otro de los orgánulos expuestos a múltiples deficiencias genéticas es el lisosoma, que desempeñan un papel esencial en la digestión de moléculas nutríceas, así como en el reciclado de componentes celulares que ya no son necesarios. Se conocen unas 40 *enfermedades lisosomales de acumulación*, de carácter hereditario, cada una de ellas caracterizada por la acumulación anómala de una o múltiples sustancias, habitualmente polisacáridos o lípidos, que en condiciones normales son catabolizados por hidrolasas lisosomales. En algunos casos, la proteína deficiente es, o una enzima clave en la hidrólisis de la sustancia, o una proteína implicada en expulsar del lisosoma a los productos de hidrólisis. En otras situaciones, las enzimas se sintetizan en cantidades normales, pero en lugar de ser dirigidas hacia los lisosomas, son segregadas hacia el medio extracelular.

Como ejemplo de este último tipo de alteraciones se encuentra la enfermedad de las células-I (I, de inclusión), debida a un defecto en la enzima N-acetilglucosamina fosfotransferasa. Esta enzima es necesaria para el procesamiento correcto de una región de las proteínas lisosomales, que va a servir como señal para que sean reconocidas y traslocadas al lisosoma. En ausencia de la señal apropiada, las enzimas hidrolíticas no son dirigidas hacia los lisosomas. Si esto ocurre, los lisosomas se llenan de polisacáridos, lípidos y otras sustancias no degradadas, aumentando mucho su volumen. Esto causa daños irreparables en las células y los tejidos.

La patología lisosomal de *Tay-Sachs* es una enfermedad rara cuya incidencia es mucho mayor entre los judíos Ashkenazi (descendientes de judíos que se establecieron en la Europa del este durante la Edad Media). En torno a los seis meses de edad, los niños homocigotos para esta alteración comienzan un rápido deterioro mental y motor, así como disfunciones esqueléticas, cardíacas y respiratorias, seguidas de demencia, parálisis, ceguera y la muerte, generalmente antes de los tres años. La patología tiene su origen en la acumulación en el tejido nervioso de un glicolípido denominado gangliósido G_{M2}. (*Véase* la estructura de los gangliósidos en la Figura 7.6.) La enzima lisosomal ausente o deficiente es la *β-N-acetilhexosaminidasa A*, que separa el extremo N-acetilgalactosamina del resto «glico» (carbohidrato) del gangliósido. El G_{M2} es un componente destacado de las membranas de las células cerebrales. No debe sorprender por tanto, que los lisosomas de los niños afectados por la enfermedad de Tay-Sachs estén llenos de fragmentos de membrana ricos en gangliósidos sin digerir.

Todas las alteraciones lisosomales conocidas se pueden diagnosticar prenatalmente. Se están desarrollando incluso *terapias de reemplazamiento enzimático* y *terapias génicas.* La terapia de reemplazamiento enzimático se ha mostrado eficaz en la enfermedad lisosomal de *Gauscher*, caracterizada por la ausencia o deficiencia de la hidrolasa glucocerebrosidasa. Cuando falta esta enzima, los lípidos denominados glucocerebrósidos se acumulan en los lisosomas de los macrófagos, que son los leucocitos que engloban y digieren materiales extraños, microorganismos, restos celulares y células dañadas completas. (La estructura de los cerebrósidos se muestra también en la Figura 7.6b.) La acumulación de glucocerebrósidos produce inflamación en hígado y bazo, anemia y retraso mental. El tratamiento depende de la posibilidad de purificar la glucocerebrosidasa de placenta humana, y administrarla por vía sanguínea después de haber sido modificada para que pueda ser reconocida por los receptores en la superficie de los macrófagos, que así la internalizan. Los macrófagos tratados de esta manera son capaces de degradar los glucocerebrósidos, pudiéndose corregir esta enfermedad que de otra manera resulta fatal.

La terapia génica es, en cierta medida, un proyecto más futurista para el tratamiento de las enfermedades de acumulación lisosomal, así como otras enfermedades hereditarias. Para ello, se precisa insertar los genes de las enzimas deficientes en las células apropiadas, lo cual permitiría, más que el simple tratamiento, la curación definitiva de la enfermedad.

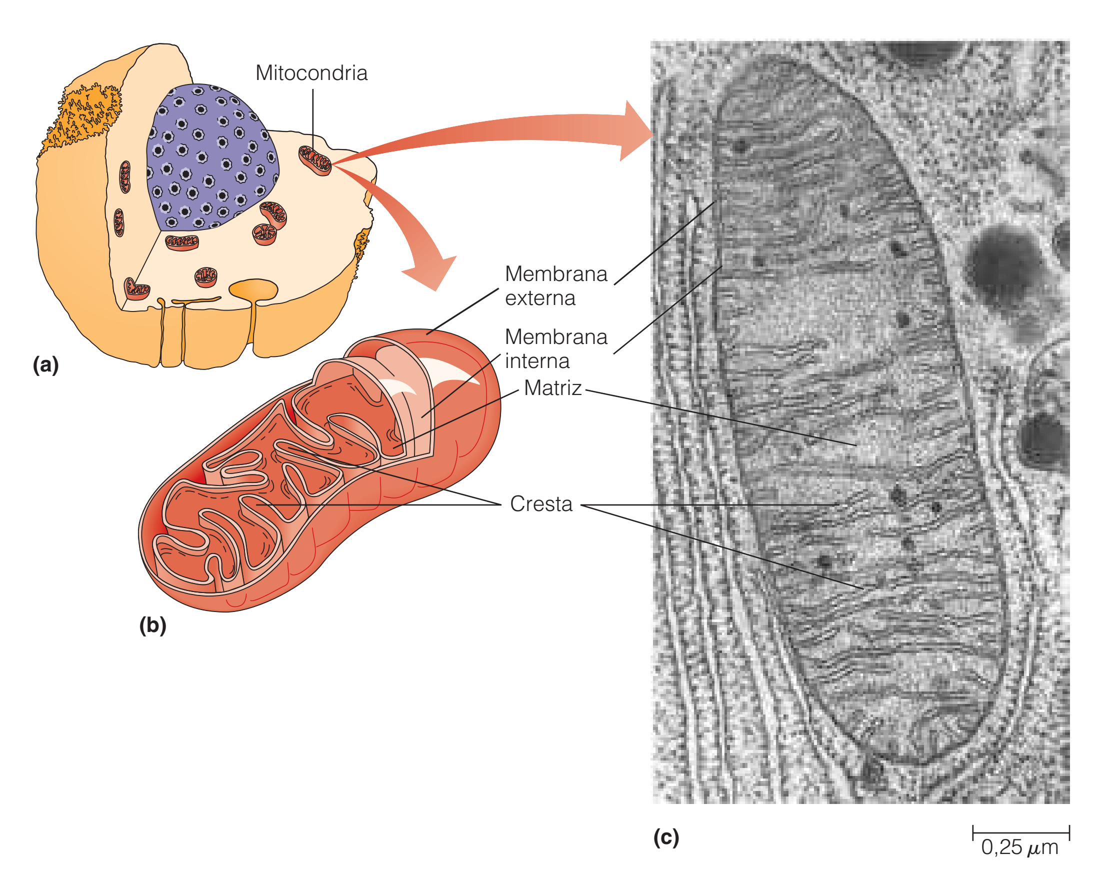
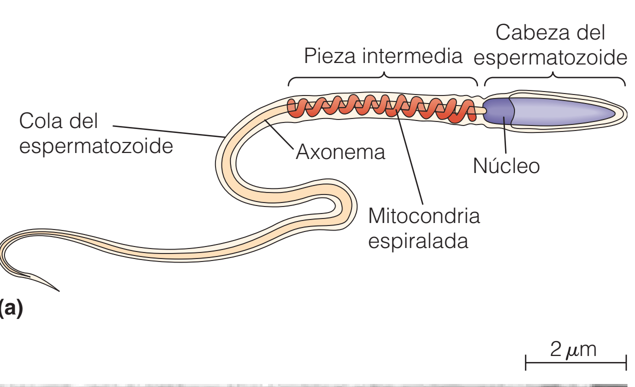


Figura 4.11 Mitocondrias. (**a**) Vista de una sección celular mostrando la proporción y tamaño de las mitocondrias en una célula animal. (**b**) Esquema de la mitocondria. (**c**) Una mitocondria en una célula del páncreas de una rata (TEM).



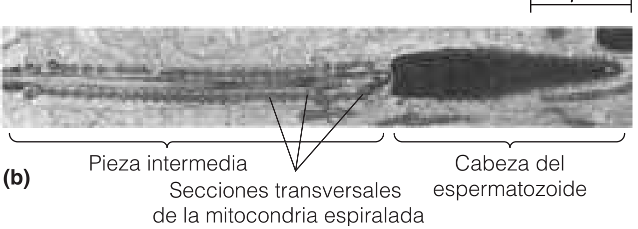


Figura 4.12 Estructura de la mitocondria en un espermatozoide. La única mitocondria que posee un espermatozoide se enrolla estrechamente alrededor del axonema de la cola, demostrando la dependencia energética que tiene dicha cola (flagelo). (**a**) Esquema del espermatozoide. (**b**) Micrografía electrónica de la cabeza y segmento intermedio de un espermatozoide de un mono tití (TEM).

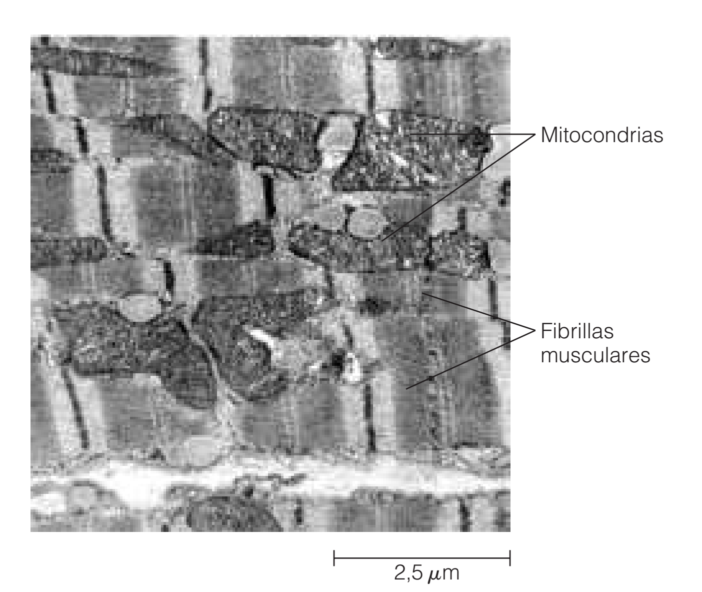


Figura 4.13 Mitocondrias en una célula muscular. Micrografía electrónica de una célula muscular cardíaca de gato, donde se aprecia la asociación estrecha entre las mitocondrias y las fibrillas musculares responsables de la contracción (TEM).

dria. El cloroplasto típico se muestra en la Figura 4.14. Es un orgánulo grande, de unos cuantos micrómetros de diámetro y de 5 a 10 μm de longitud. Los cloroplastos son, por tanto, sustancialmente mayores que la mitocondria y más grandes que cualquier otra estructura celular, a excepción del núcleo. Al igual que las mitocondrias, los cloroplastos están rodeados por una membrana interna y otra externa. Además, tienen un tercer sistema de membranas consis-

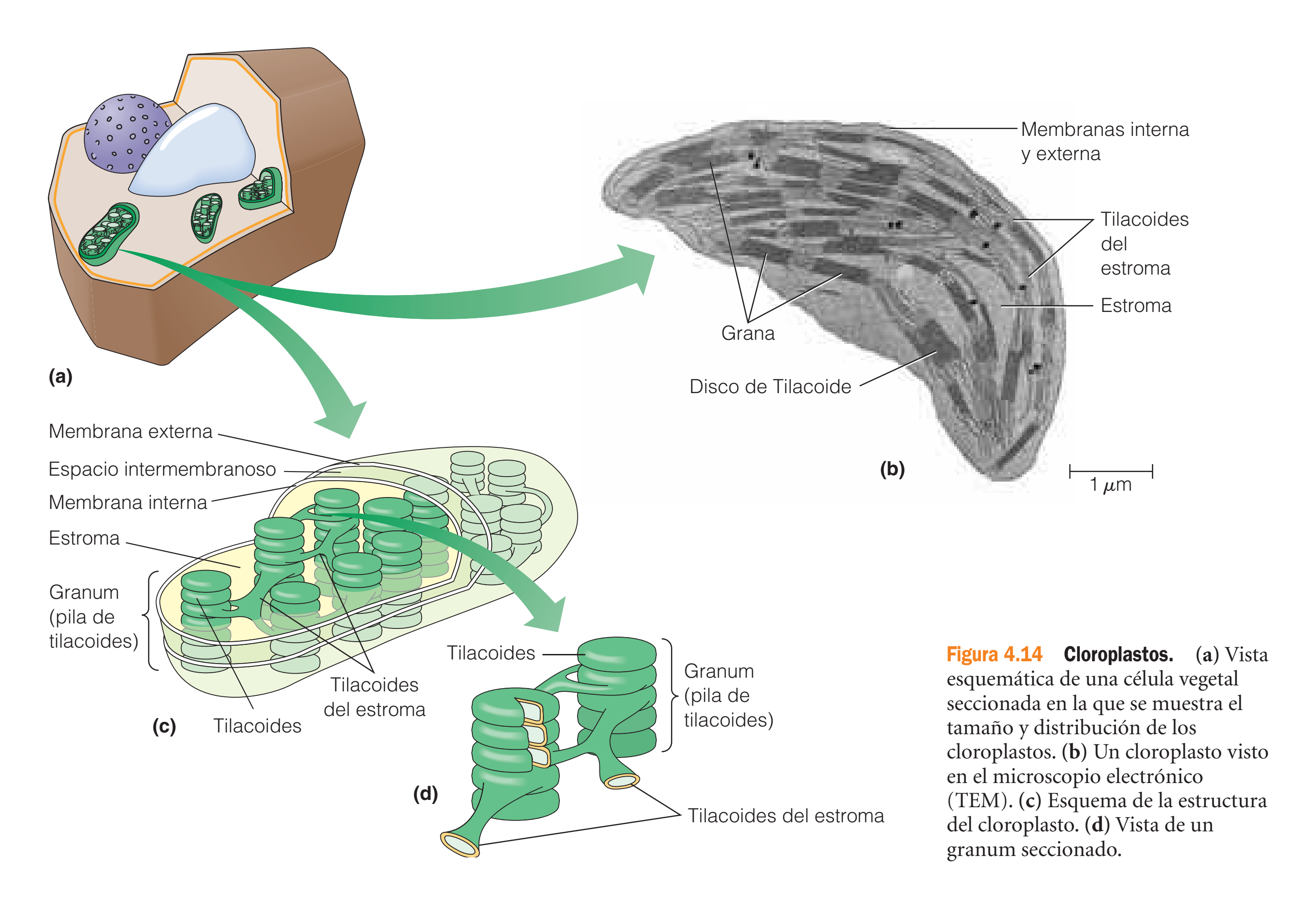


Figura 4.14 Cloroplastos. (**a**) Vista esquemática de una célula vegetal seccionada en la que se muestra el tamaño y distribución de los cloroplastos. (**b**) Un cloroplasto visto en el microscopio electrónico (TEM). (**c**) Esquema de la estructura del cloroplasto. (**d**) Vista de un granum seccionado.

tente en sáculos aplanados llamados **tilacoides** interconectados entre sí por otras membranas denominadas **tilacoides del estroma**.

Aunque son bien conocidos por su papel en la fotosíntesis, los cloroplastos intervienen también en otros muchos procesos celulares. Un importante ejemplo es la reducción del nitrógeno desde la forma de nitrato (NO_3^-), que es en la que las plantas lo obtienen del suelo, hasta la forma amoniacal (NH_3), que es la requerida para la síntesis de proteínas. El metabolismo del azufre también se realiza en este orgánulo. Por otra parte, el cloroplasto es tan sólo el ejemplo más destacado de una categoría de orgánulos vegetales, conocidos como **plastidios**. Los plastidios realizan funciones muy diferentes en las células vegetales. Los *cromoplastos*, por ejemplo, son plastidios que contienen pigmentos responsables de la coloración característica de las flores, los frutos y otras estructuras de la planta. Los amiloplastos son plastidios especializados en el almacenamiento de almidón.

La teoría endosimbiótica: ¿han evolucionado las mitocondrias y los cloroplastos desde una bacteria ancestral? Habiendo considerado ahora mismo a las mitocondrias y a los cloroplastos como orgánulos eucariontes, vamos a hacer una pausa para una breve digresión concerniente a su posible origen evolutivo. Ambos orgánulos contienen su propio DNA y ribosomas que les facultan para llevar a cabo la síntesis del RNA y las proteínas (aunque la mayoría de las proteínas presentes en mitocondrias y cloroplastos están codificadas por genes nucleares). Cuando los biólogos moleculares estudiaron los ácidos nucleicos y la síntesis de proteínas en estos orgánulos, no pudieron por menos que pararse a pensar en las muchas similitudes que estos procesos tenían cuando se comparaban con los de las células procariontes. Se observaban, por ejemplo, semejanzas en la organización del DNA (moléculas circulares sin histonas asociadas), secuencias de rRNA, tamaño ribosómico, sensibilidad a inhibidores de la síntesis de RNA y de proteínas y factores proteicos propios de la iniciación de la síntesis de proteínas. Además, las mitocondrias y los cloroplastos recuerdan también a las bacterias por su tamaño y forma.

Estas similitudes dieron origen a la **teoría endosimbiótica** del origen de mitocondrias y cloroplastos. Esta teoría, descrita en detalle en el Anexo 11A de las páginas 322-323, propone que ambos orgánulos se originaron a partir de células procariotas que se introdujeron, estableciendo una relación simbiótica, en el citoplasma de organismos unicelulares ancestrales conocidos como *protoeucariotas.* (En biología, la *simbiosis* hace referencia a la vida en común de dos organismos o células para su mutuo beneficio). La teo-

ría endosimbiótica presupone que los protoeucariotas desarrollaron dos características que los distinguían de otras células existentes en su tiempo: el gran tamaño y la capacidad de digerir nutrientes desde el medio, por un proceso denominado *fagocitosis*. Estas características permitieron a las células protoeucariontes ingerir a procariotas (bacterias y cianobacterias) que con el tiempo evolucionaron, respectivamente, hacia mitocondrias y cloroplastos.

Retículo endoplásmico. Extendiéndose a través del citoplasma de prácticamente todas las células eucariotas, aparece una red de membranas denominada **retículo endoplásmico**, o **RE** (Figura 4.15). El nombre suena complicado, pero *endoplásmico* significa exactamente «dentro del plasma» (de la célula) y *retículo* hace referencia a una «red». El retículo endoplásmico consiste en un sistema de membranas tubulares y sacos aplanados o **cisternas**, que parecen estar interconectados. El espacio interno encerrado por las membranas del RE se denomina **luz** o **lumen**. El RE continúa por la membrana externa de la envuelta nuclear (*véase* Figura 4.15a). El espacio entre las dos membranas nucleares es, por tanto, parte del mismo compartimiento que la luz del RE.

El RE puede ser rugoso o liso. El **retículo endoplásmico rugoso** (RE rugoso) tiene aspecto «rugoso» al microscopio electrónico, porque está salpicado de ribosomas en el lado de la membrana que mira hacia el citosol (Figura 4.15b y d). Estos ribosomas están sintetizando proteínas activamente. La mayoría de esas proteínas se insertan o transportan a través de la membrana del retículo, a la vez que son sintetizadas, siendo su destino final dicha membrana, o la luz del RE. Esta es la forma en la que se sintetizan las *proteínas de secreción* (proteínas destinadas a ser exportadas desde la célula). Posteriormente, se dirigen hacia la superficie celular en un proceso complejo que implica, no sólo al RE rugoso, sino también al aparato de Golgi y a las vesículas de secreción, como veremos en breve.

Sin embargo, no todas las proteínas se sintetizan en el RE. Muchas lo hacen en ribosomas que no están anclados al RE, sino que aparecen libres en el citosol (Figura 4.15d). En términos generales, las proteínas de secreción y las de las membranas se producen en los ribosomas asociados al RE, mientras que las proteínas que van a residir en el citosol se sintetizan en los ribosomas libres.

El **retículo endoplásmico liso** (**RE liso**) no interviene en la síntesis de proteínas y, por tanto, no tiene ribosomas asociados. De ahí su apariencia lisa cuando es observado en el microscopio electrónico (Figura 4.15c). El RE liso participa en la síntesis de lípidos y esteroides, como el colesterol y las hormonas esteroídicas derivadas de él. Además, el RE liso es responsable de la inactivación y detoxificación de drogas y otros componentes potencialmente tóxicos o peligrosos para la célula.

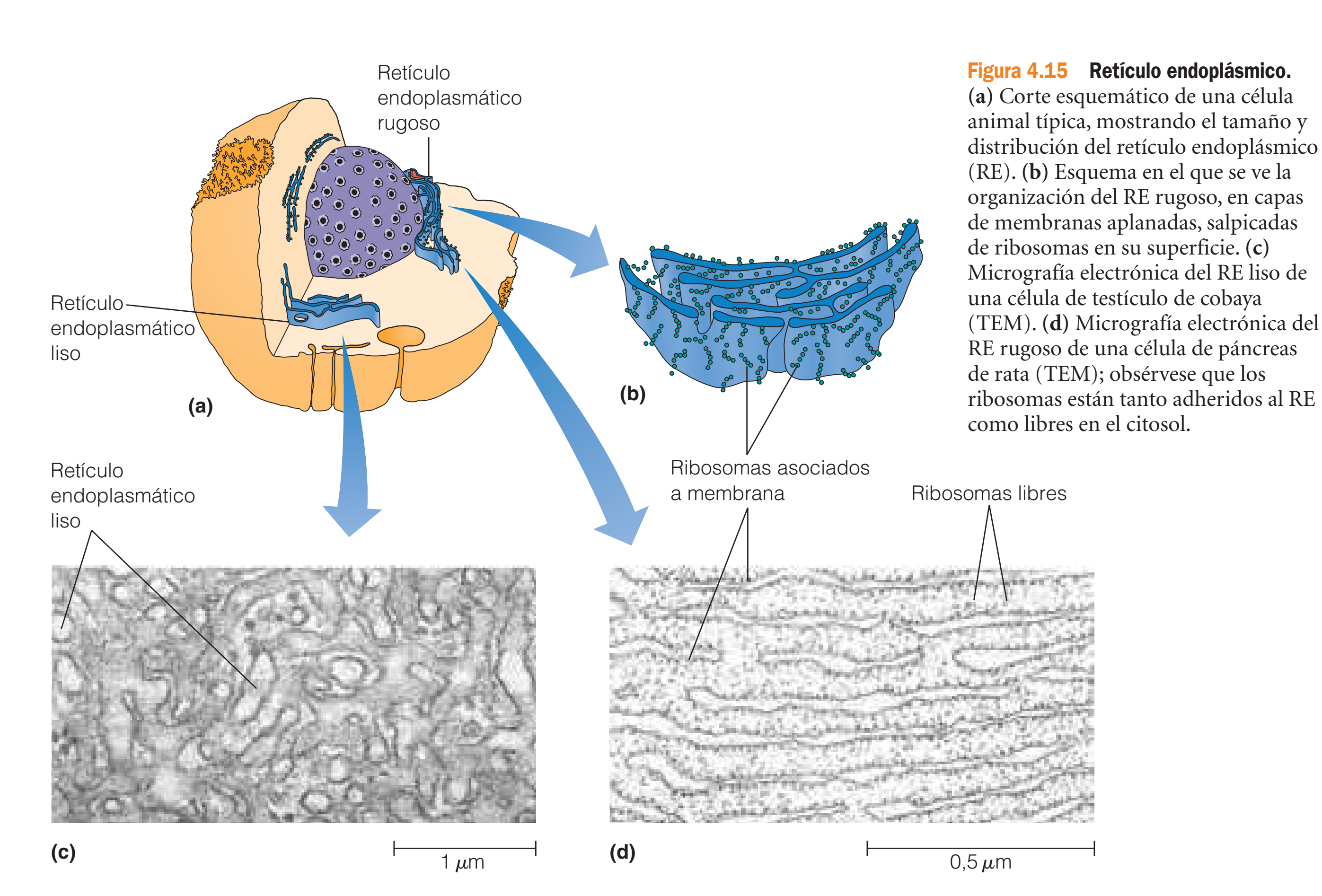


Figura 4.15 Retículo endoplásmico. (**a**) Corte esquemático de una célula animal típica, mostrando el tamaño y distribución del retículo endoplásmico (RE). (**b**) Esquema en el que se ve la organización del RE rugoso, en capas de membranas aplanadas, salpicadas de ribosomas en su superficie. (**c**) Micrografía electrónica del RE liso de una célula de testículo de cobaya (TEM). (**d**) Micrografía electrónica del RE rugoso de una célula de páncreas de rata (TEM); obsérvese que los ribosomas están tanto adheridos al RE como libres en el citosol.

El complejo de Golgi. Estrechamente relacionado con el RE, tanto por su proximidad, como por su función, se encuentra el **complejo de Golgi** (o *aparato de Golgi*), denominado así en honor a su descubridor, el italiano Camilo Golgi. El complejo de Golgi, mostrado en la Figura 4.16, consiste en una pila de vesículas aplanadas. Desempeña un papel importante en el procesamiento y empaquetamiento de proteínas de secreción y en la síntesis de polisacáridos complejos. Las vesículas que parten del RE son aceptadas por el complejo de Golgi. Aquí el contenido de las vesículas (en su mayor parte proteínas) y, en ocasiones, las membranas vesicales continúan su procesamiento. Finalmente son transferidas a otras regiones celulares por medio de vesículas que se forman por gemación desde el complejo de Golgi (Figura 4.16c).

La mayoría de las proteínas de membrana y de secreción son glicoproteínas. Los primeros pasos en la glicosilación (adición de cadenas cortas de hidratos de carbono) tienen lugar en la luz del RE rugoso, pero el proceso se completa, generalmente, en el aparato de Golgi. El complejo de Golgi debe ser, por tanto, considerado como una estación de procesamiento, a la cual llegan y de la cual parten las vesículas. Prácticamente todo lo que ingresa en él vuelve a salir, si bien modificado, empaquetado y listo para ser exportado desde la célula.

Vesículas de secreción. Una vez procesadas en el complejo de Golgi, las proteínas de secreción y otras sustancias destinadas a ser exportadas desde la célula, se empaquetan en **vesículas de secreción**. Las células del páncreas, por ejemplo, contienen muchas de estas vesículas, puesto que esta glándula es responsable de la síntesis de muchas enzimas digestivas. Las enzimas se sintetizan en el RE rugoso, se empaquetan en el complejo de Golgi y son luego liberadas desde la célula en forma de vesículas de secreción, como se muestra en la Figura 4.17. Las vesículas parten de la región del complejo de Golgi y se dirigen hacia la membrana plasmática, con la cual se fusionan, descargando su contenido por exocitosis. La síntesis, procesamiento y exportación de proteínas por medio del RE, el complejo de Golgi y las vesículas de secreción, se considerará detalladamente en el Capítulo 12.

Lisosomas. El siguiente cuadro de nuestra exposición celular es el **lisosoma**, un orgánulo de aproximadamente 0,5-1,0 μm de diámetro y limitado por una membrana única (Figura 4.18). Los lisosomas fueron descubiertos a principios de la década de 1950 por Christian de Duve y sus colaboradores. La historia de su descubrimiento se narra en el Anexo 4B, donde se comprueba la importancia de las observaciones casuales cuando son hechas por investigadores astutos y se ilustra la importancia que tienen las nuevas técnicas en el progreso de la ciencia.

Los lisosomas son empleados por las células como el lugar de almacenamiento de hidrolasas, enzimas capaces de digerir moléculas biológicas, tales como proteínas, hidratos de carbono o lípidos. Es importante que las células posean estas enzimas, tanto para digerir las moléculas nutricias que se adquieren del medio, como para degradar constituyentes celulares que ya no son necesarios. Pero es

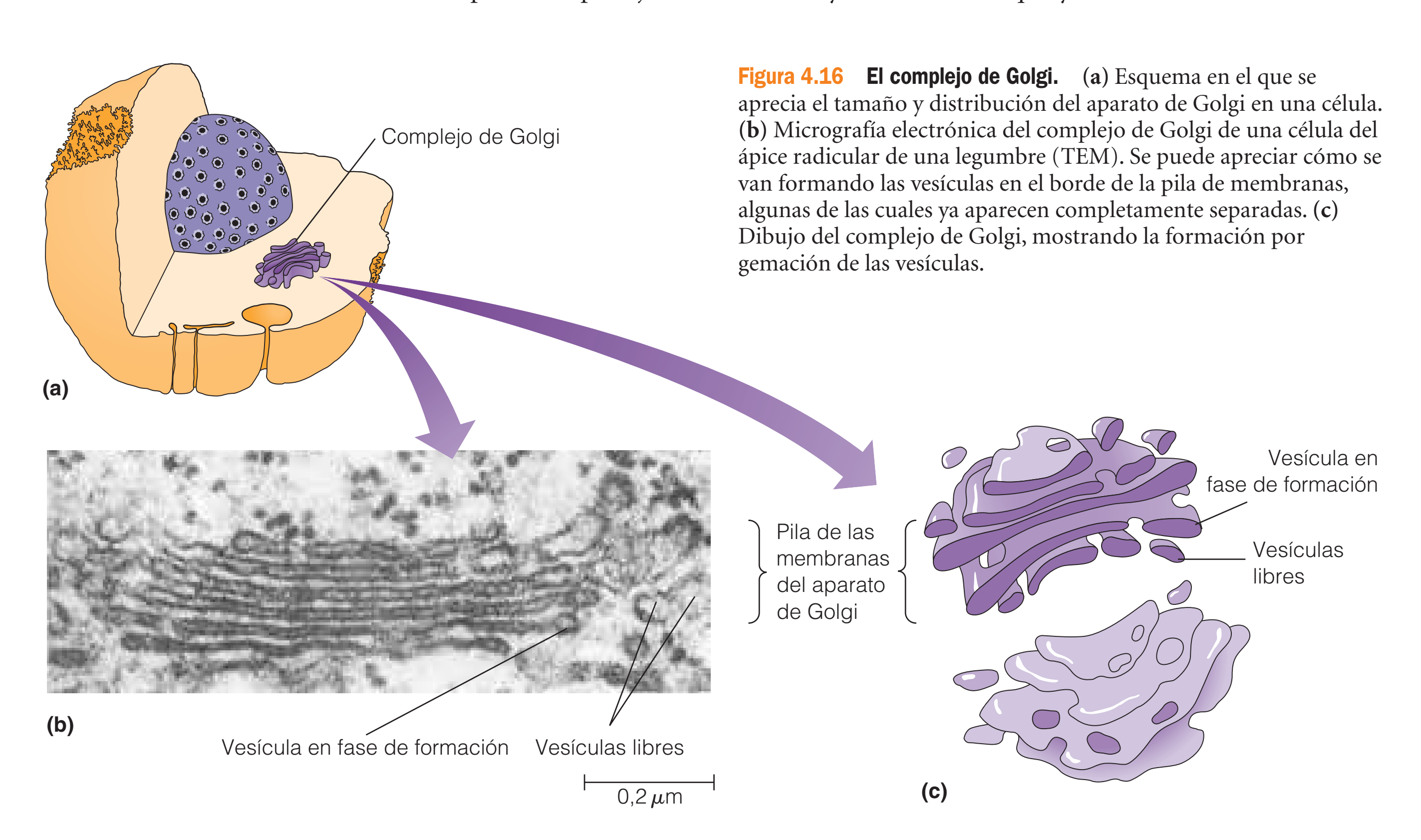


Figura 4.16 El complejo de Golgi. (**a**) Esquema en el que se aprecia el tamaño y distribución del aparato de Golgi en una célula. (**b**) Micrografía electrónica del complejo de Golgi de una célula del ápice radicular de una legumbre (TEM). Se puede apreciar cómo se van formando las vesículas en el borde de la pila de membranas, algunas de las cuales ya aparecen completamente separadas. (**c**) Dibujo del complejo de Golgi, mostrando la formación por gemación de las vesículas.

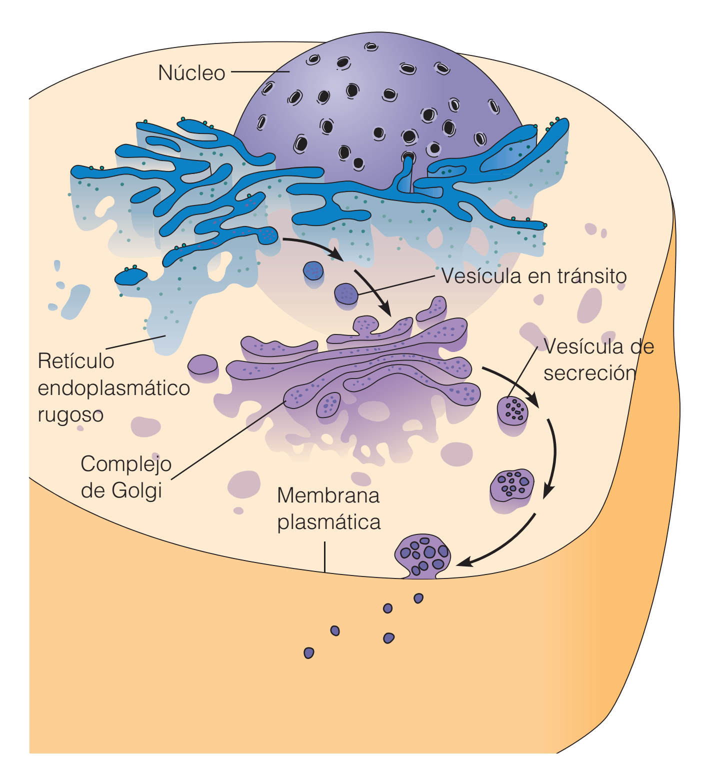


Figura 4.17 **El proceso de secreción en las células eucariontes.** Las proteínas que van a ser exportadas se sintetizan en el RE rugoso, se transfieren al complejo de Golgi y, eventualmente, se empaquetan en vesículas de secreción. Posteriormente, las vesículas se dirigen a la membrana plasmática, con la cual se fusionan, liberando su contenido al medio extracelular.

también esencial que dichas enzimas estén cuidadosamente secuestradas hasta que sean requeridas, y así evitar la digestión de aquellos componentes celulares, cuya destrucción no haya sido programada.

Los lisosomas están íntimamente relacionados con el RE y el complejo de Golgi. Las enzimas lisosomales son, en cierta medida, semejantes a las proteínas de secreción, en lo que respecta a su síntesis y procesamiento. Se sintetizan en el RE rugoso y se transportan al aparato de Golgi, donde se les añade una señal manosa-6-fosfato, que las identifica como enzimas de este orgánulo. Posteriormente, son empaquetadas en vesículas y transportadas a orgánulos denominados *endosomas tempranos*, que maduran progresivamente hacia *endosomas tardíos*. Un endosoma tardío es, por tanto, una colección de enzimas digestivas recién sintetizadas y empaquetadas de manera que son inactivas hasta que sus funciones hidrolíticas son requeridas.

El endosoma tardío puede madurar para formar un nuevo lisosoma o transferir su componente enzimático a un lisosoma activo. El amplio repertorio de hidrolasas permite a los lisosomas degradar, virtualmente, cualquier tipo de molecula biológica. Finalmente, los productos de digestión son suficientemente pequeños para atravesar la membrana y alcanzar el citosol, donde pueden ser utilizados de nuevo para la síntesis de macromoléculas. ¡El reciclado también tiene lugar en el nivel molecular!

Peroxisomas. El siguiente orgánulo de nuestra exposición es el **peroxisoma**. Los peroxisomas recuerdan a los lisosomas por su tamaño y la ausencia de una estructura interna aparente. Están también rodeados por una membrana simple. Aparecen en células de vegetales superiores y animales, así como en hongos, protozoos y algas. Según el tipo celular, intervienen en diferentes funciones, pero siempre, como resultado de la actividad, se forma y degrada peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El peróxido de hidrógeno es muy tóxico para las células, pero puede ser degradado en agua y oxígeno por la enzima *catalasa*. Las células eucariontes se protegen de los efectos deletéreos del peróxido de hidrógeno, confinando en el peroxisoma, tanto a la catalasa, como a las reacciones que generan dicho peróxido.

En los animales, los peroxisomas se encuentran en la mayoría de las células, pero son especialmente abundantes en las del hígado y el riñón (Figura 4.19). Además de su papel en la detoxificación del peróxido de hidrógeno, los peroxisomas animales cumplen otras funciones, incluyendo la neutralización de otros compuestos peligrosos (como el metanol, el etanol, el formato y el formaldehído) y el catabolismo de sustancias extrañas (tales como los D-aminoácidos). Algunos investigadores sostienen que los peroxisomas pueden estar implicados en la regulación de la tensión de oxígeno dentro de la célula.

Los peroxisomas animales intervienen también en la degradación oxidativa de los ácidos grasos, que son componentes de los triacilgliceroles, los fosfolípidos y los glicolípidos (*véase* Figura 3.27). Como veremos en el Capítulo 10, la hidrólisis de ácidos grasos ocurre primariamente en las mitocondrias. Sin embargo, los ácidos grasos de más de 12 átomos de carbono se oxidan muy lentamente en éstas. Por contra, en los peroxisomas se oxidan con facilidad los ácidos grasos de hasta 22 átomos de carbono. Las cadenas largas se degradan eliminando los átomos de carbono de dos en dos, hasta alcanzar una longitud (10-12 átomos de carbono) fácilmente abordable por la mitocondria.

El papel esencial de los peroxisomas en la hidrólisis de ácidos grasos de cadena larga, queda de manifiesto por la existencia de enfermedades humanas graves, derivadas de la ausencia o disfunción de enzimas del peroxisoma, que están implicadas en la degradación de ácidos grasos. Una de las enfermedades es la adrenoleucodistrofia neonatal (NALD), alteración ligada al sexo (sólo en los varones) que cursa con alteraciones neurológicas profundas y finalmente la muerte. (Para más detalles acerca de la NALD y otras alteraciones asociadas al peroxisoma, véase el Anexo 4A en las páginas 92-95).

Donde mejor se conoce el papel de los peroxisomas en el metabolismo, es en las células vegetales. Durante la germinación de las semillas oleosas, un tipo especial de peroxisomas, denominados **glioxisomas**, intervienen en la

Lisosomas

(a)

Lisosomas

Núcleo

(b) 0,5 μm

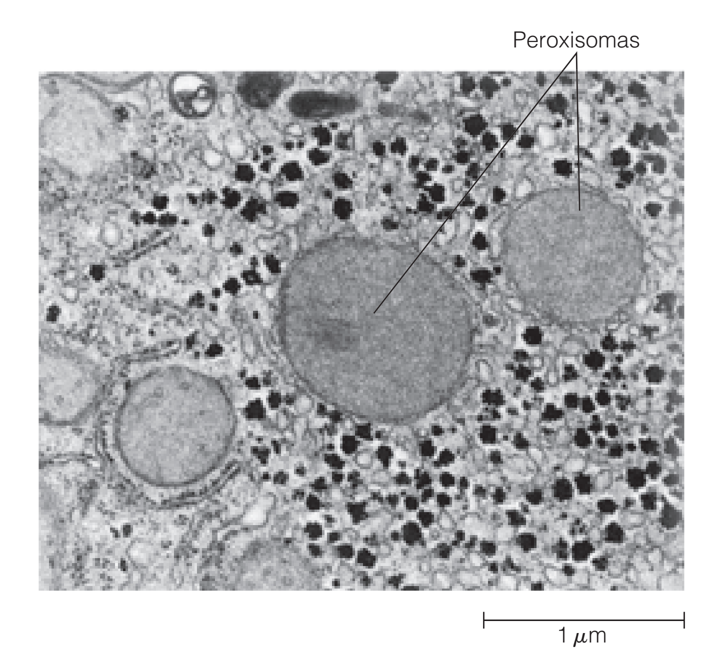
(c) 1 μm

Figura 4.18 Lisosomas. (**a**) Vista del interior de una célula en la que se destacan los lisosomas. (**b**) Lisosomas de una célula animal teñidos por métodos citoquímicos para determinar la presencia de la enzima lisosomal fosfatasa ácida. La reacción citoquímica se caracteriza por la presencia de precipitados de fosfato de plomo en los lugares de actividad fosfatasa ácida (TEM). (**c**) Micrografía electrónica de lisosomas en dos células adyacentes del epitelio del epidídimo humano.

conversión de las reservas lipídicas en hidratos de carbono. En los tejidos fotosintéticos, los **peroxisomas foliares** destacan por su papel en la *fotorrespiración*, ruta dependiente de la luz que reduce la eficacia de la fotosíntesis en muchos vegetales, liberando parte de los carbonos que han sido fijados en los cloroplastos (se discutirá más en detalle en el Capítulo 11). La ruta de la fotorrespiración es un ejemplo de un proceso celular único que precisa de la intervención de varios orgánulos. Algunas enzimas que catalizan las reacciones de este proceso secuencial, están en los peroxisomas, mientras que otras aparecen en los cloroplastos o las mitocondrias. Esta relación mutua queda reflejada en la asociación íntima de los peroxisomas con las mitocondrias y los cloroplastos, que se observa en muchas células vegetales, como se aprecia en la Figura 4.20.

Vacuolas. Las células contienen también otros orgánulos rodeados de membrana, llamados **vacuolas**. En las células animales las vacuolas se usan frecuentemente para el almacenamiento temporal o el transporte. Algunos protozoos, por ejemplo, ingieren partículas de alimento u otros materiales del medio en un proceso denominado *fagocitosis* (»ingesta celular»). La fagocitosis es una forma de endocitosis en la que la membrana de la célula rodea y engloba a la sustancia deseada; la vesícula en formación se extiende e

Peroxisomas



1 μm

Figura 4.19 Peroxisomas animales. En este detalle de una célula hepática, se observan varios peroxisomas (TEM). Estos orgánulos aparecen en la mayoría de las células animales, pero son especialmente abundantes en las células de hígado y del riñón.

Descubriendo los orgánulos: la importancia de las centrífugas y las observaciones casuales

¿Se ha preguntado alguna vez cómo han sido descubiertos los orgánulos intracelulares de las células eucariontes? Hay casi tantas respuestas a esa pregunta como tipos de orgánulos. En general ya habían sido descritos por los microscopistas antes de que su función fuera comprendida. Como resultado, los nombres de los orgánulos no suelen reflejar su función. Así, *cloroplasto* significa simplemente «partícula verde» y *retículo endoplásmico*, «red del plasma (de la célula)».

Sin embargo, éste no es el caso del lisosoma. Este orgánulo fue descrito por sus propiedades bioquímicas antes de que hubiera sido descrito por los microscopistas. Sólo después de que los análisis de fraccionamiento hubieran predicho su existencia y propiedades, los lisosomas fueron observados en las células. Su nombre lleva implícita una sugerencia a su función, pues la raíz griega *lis* significa «digerir». (El significado literal es «aflojar», ¡pero eso es precisamente lo que la digestión hace con los enlaces químicos!).

El lisosoma es, en cierta medida, un recién llegado al escenario de la biología celular; no fue descubierto hasta el principio de los años 50. La historia de su descubrimiento es fascinante, porque ilustra lo importante que pueden ser las observaciones casuales, especialmente cuando se hacen por las personas apropiadas en el momento justo. Ilustra también lo necesarias que pueden ser las nuevas técnicas, pues su descubrimiento estuvo ligado al fraccionamiento subcelular, una técnica en aquel entonces estaba todavía en su infancia.

La historia comienza en 1949 en el laboratorio de Christian de Duve, que más tarde recibiría el Premio Nobel por este trabajo. Como otros muchos avances científicos, el descubrimiento de los lisosomas tuvo lugar por una observación casual hecha por un investigador astuto. Como consecuencia de su interés en el efecto de la insulina en el metabolismo de los hidratos de carbono, de Duve estaba interesado en conocer la localización celular de la enzima glucosa-6-fosfatasa, la enzima responsable de la liberación de glucosa libre en los hepatocitos. Como enzima de control (es decir, una no implicada en el metabolismo de carbohidratos), de Duve eligió a la fosfatasa ácida.

De Duve empezó por homogeneizar el hígado y resuspenderlo en varias fracciones por medio de la nueva técnica de centrifugación diferencial, que permite separar los componentes celulares en base a sus diferencias en tamaño y densidad. De esta forma, fue capaz de demostrar que la actividad glucosa-6-fosfatasa se recuperaba de la fracción microsomal. (Los microsomas son vesículas pequeñas que resultan de la fragmentación del RE cuando se homogeniza un tejido.) Ésta en sí misma fue una observación importante porque ayudó al establecimiento de la identidad de los microsomas, que en aquella época tendían a ser considerados como fragmentos mitocondriales.

Pero los resultados de la fosfatasa ácida fueron aún más interesantes, si bien al principio resultaban desconcertantes. Cuando de Duve y sus colaboradores hicieron ensayos de la enzima en sus homogeneizados de hígado, sólo recuperaban una fracción de la actividad esperada. Sin embargo, al ensayar de nuevo la misma enzima unos días más tarde, el mismo homogeneizado tenía una actividad unas 10 veces mayor.

Pensando que se enfrentaba a algún tipo de fenómeno de activación, de Duve sometió a los homogeneizados a centrifugación diferencial para ver a cuál de las fracciones se asociaba el fenómeno. Él y sus colaboradores fueron capaces de

---

internaliza posteriormente, quedando como una vacuola alrededor la partícula.

Las células vegetales también desarrollan vacuolas. De hecho la presencia de una gran vacuola es una característica habitual en la mayoría de las células vegetales maduras (Figura 4.21). Esta vacuola, a veces denominada **vacuola central**, puede intervenir en fenómenos de almacenamiento de sustancias y es incluso capaz de intervenir en la digestión intracelular, desarrollando una actividad de tipo lisosomal. Sin embargo, su papel fundamental se centra en el mantenimiento de la presión de turgencia de las células vegetales. Como ya sabemos, la célula vegetal está rodeada de una pared celular rígida. La vacuola tiene una concentración alta de solutos y está rodeada por una membrana de permeabilidad selectiva, denominada *tonoplasto*. Como respuesta a la alta concentración de solutos en el interior de la vacuola, el agua tiende a entrar a través del tonoplasto, haciendo que la vacuola se hinche. El resultado es que la vacuola presiona al resto de los constituyentes celulares contra la pared, manteniendo así la turgencia característica de los tejidos vegetales. La apariencia flácida de una planta mustia se debe a que la vacuola central no es capaz de alcanzar la turgencia adecuada haciendo que la célula (y por tanto el tejido) pierdan consistencia. Esto se puede comprobar fácilmente, poniendo unas ramas de apio en agua salada. La alta concentración de sal en el exterior de las células hace que el agua salga de ellas, disminuyendo la turgencia, por lo que los tejidos se tornan flácidos y las ramas tienen aspecto de estar pasadas.

Ribosomas. El último cuadro de nuestra galería es el **ribosoma**. En términos estrictos, el ribosoma no es en realidad un orgánulo, puesto que está desprovisto de membrana. Lo consideraremos aquí, porque los ribosomas, como otros orgánulos, son el lugar donde se desarrolla una actividad celular específica —en este caso, la síntesis de proteínas. A diferencia de muchos orgánulos verdaderos, los ribosomas aparecen, tanto en células procariontes, como en eucarion-

demostrar que gran parte de la actividad fosfatasa ácida se podía recuperar de la fracción mitocondrial, y que esta fracción era incluso mayor si los homogeneizados se dejaban varios días.

Para sorpresa, descubrieron que, tras centrífugar de nuevo, la actividad no residía en el sedimento, con las mitocondrias, sino que quedaba retenida en el sobrenadante. Prosiguieron comprobando que la actividad y la solubilidad de la enzima aumentaban con diferentes tratamientos, incluyendo el aplastamiento violento, la congelación y descongelación y la exposición a detergentes o condiciones hipotónicas. A partir de estos resultados, de Duve concluyó que la enzima debía estar presente en algún tipo de partícula rodeada de membrana, que se pudiera romper. Aparentemente, la enzima no podría ser detectada dentro de la partícula, probablemente porque la membrana no era permeable a los sustratos empleados en el ensayo enzimático.

Asumiendo que la partícula era una mitocondria, continuaron aislando y estudiando esta fracción de sus homogeneizados hepáticos. En este momento, se produjo otra casualidad, esta vez la rotura de una centrífuga. La rotura inesperada forzó a uno de los estudiantes de de Duve a usar una centrífuga vieja, más lenta, con el resultado de que la fracción mitocondrial contenía muy poca o ninguna fosfatasa ácida. De Duve concluyó de estos resultados inesperados, que la fracción mitocondrial en la forma en la que solían prepararla, contenía en realidad dos orgánulos: las mitocondrias reales, que podrían ser sedimentadas con cualquiera de las dos centrífugas y un tipo de partícula de sedimentación más lenta que sólo bajaría con la centrífuga más rápida.

De esta manera propusieron un esquema de fraccionamiento en el que la fracción mitocondrial original se podía subdividir en un componente rápido y otro lento. Como se puede suponer, el componente de sedimentación rápido contenía a las mitocondrias, como se demostró por la presencia de enzimas conocidas de estos orgánulos. La fosfatasa ácida, por otra parte, parecía en el componente de sedimentación lenta, junto con otras enzimas hidrolíticas, entre las que se incluían la ribonucleasa, la desoxirribosanucleasa, la β-glucoronidasa y una proteasa. Todas esas enzimas compartían la característica de aumentar su actividad después de la ruptura de membranas, propiedad de esta que de Duve denominó *latencia.*

En 1955, de Duve llegó al convencimiento de que las enzimas hidrolíticas se almacenaban en un orgánulo no descrito hasta entonces. En consonancia con su idea de que este orgánulo era el responsable de la lisis (digestión) intracelular, lo denominó *lisosoma.*

Así, el lisosoma fue el primer orgánulo identificado completamente por criterios bioquímicos. Por aquel entonces tal partícula no había sido aún descrita al microscopio. Pero cuando las fracciones que contenían los lisosomas fueron examinadas en el microscopio electrónico, se encontró que contenían vesículas rodeadas de membrana, claramente diferentes de las mitocondrias y, de hecho, ausentes en la fracción mitocondrial. Sabiendo el aspecto que tenían las partículas aisladas, los micros copistas fueron capaces de encontrarlas en tejidos fijados. Los lisosomas se identificaron rápidamente y se comprobó su presencia en varios tejidos animales. En el plazo de seis años el orgánulo, que comenzó como una observación inesperada en un experimento con insulina, se convirtió una cualidad definitoria en la mayoría de las células animales.

tes. Pero incluso aquí se manifiesta la dicotomía entre los dos tipos celulares básicos: los ribosomas de procariotas y eucariotas difieren en tamaño y número, y en la naturaleza de las moléculas proteicas y de RNA que contienen. Los ribosomas mantienen también la separación molecular entre eubacterias y arqueas; de hecho, como veremos más tarde, los científicos identificaron ambos grupos en base a diferencias características en sus secuencias del RNA ribosómico.

Incluso comparándolos con los orgánulos más pequeños, los ribosomas aparecen como estructuras minúsculas. Los ribosomas de células eucariontes y procariontes miden unos 30 y 25 nm, respectivamente. Se requiere, lógicamente, el microscopio electrónico, para poder visualizarlos (*véase* Figura 4.15). Para apreciar lo pequeños que son, en una bacteria típica hay unos 350.000 ribosomas y, ¡aún sobra espacio!

Otra forma de expresar el tamaño de estas partículas es haciendo referencia a su **coeficiente de sedimentación**. El coeficiente de sedimentación de una partícula o macromoléculas es una medida de su velocidad de sedimentación en una ultracentrífuga y se expresa en *unidades Svedberg (S)*. Los coeficientes de sedimentación se usan habitualmente para indicar el tamaño relativo de macromoléculas grandes, tales como proteínas y ácidos nucleicos y de partículas pequeñas, como los ribosomas. Los ribosomas de las células eucariontes tienen un coeficiente de sedimentación de aproximadamente 80S; el de las células procariontes es de unos 70S (*véase* Tabla 4.1).

El ribosoma está formado por dos subunidades diferentes en tamaño, forma y composición (Figura 4.22). En las células eucariontes, las **subunidades ribosómicas grande** y **pequeña** tienen coeficientes de sedimentación de unos 60S y 40S, respectivamente. (Obsérvese que el coeficiente de sedimentación del ribosoma completo no es la suma de los coeficientes de las subunidades; esto es porque dicho coeficiente depende tanto del tamaño como de la forma y, por tanto, no está en relación directa con el peso

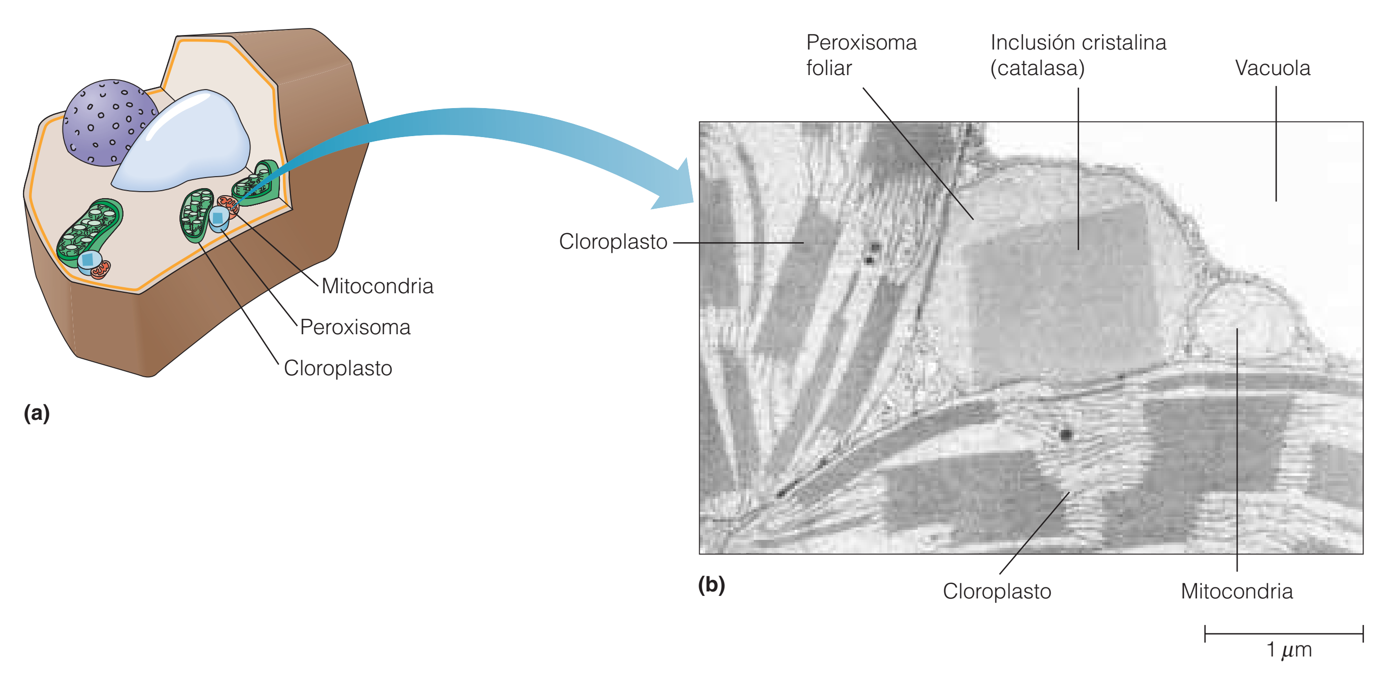


Figura 4.20 Peroxisomas foliares y su relación con otros orgánulos de una célula vegetal. (**a**) Esquema de una célula seccionada, en la que aparecen un peroxisoma, una mitocondria y un cloroplasto. (**b**) Peroxisoma junto a un cloroplasto y una mitocondria en una célula de una hoja de tabaco (TEM). Ésta es una relación posiblemente funcional, pues los tres orgánulos participan en el proceso de la fotorrespiración. El núcleo cristalino que se observa frecuentemente en los peroxisomas foliares es la enzima catalasa, que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.

molecular.) Tanto en las células eucariontes, como en las procariontes, las subunidades del ribosoma se sintetizan y ensamblan en la célula de forma separada, si bien se reúnen cuando se van a fabricar las proteínas.

Los ribosomas son mucho más numerosos que la mayoría de las demás estructuras intracelulares. Las células procariontes tienen miles de ribosomas y las eucariontes cientos de miles o incluso millones. Los ribosomas están

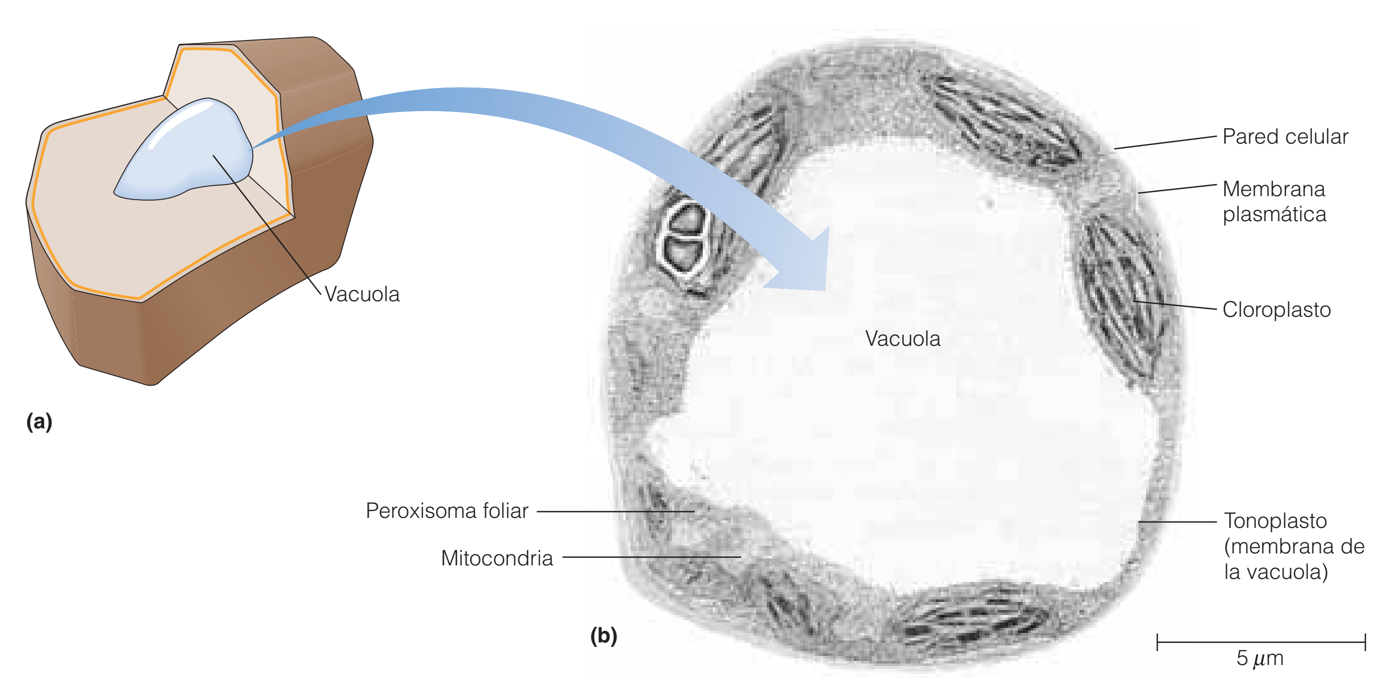


Figura 4.21 Vacuola en una célula vegetal. (**a**) Vista de una célula vegetal seccionada, mostrando una vacuola. (**b**) Micrografía electrónica de una célula de una hoja de una alubia, con una gran vacuola en el centro (TEM). La vacuola ocupa una gran parte del interior celular, relegando al citoplasma a la periferia, donde forma una fina esfera entre la vacuola y la membrana plasmática. La membrana de la vacuola se denomina tonoplasto.

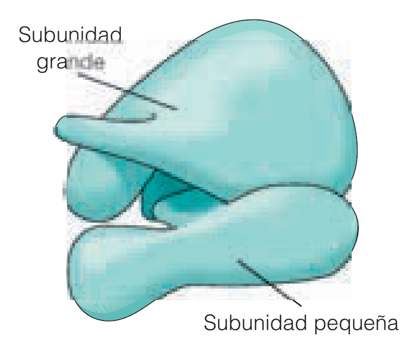


Figura 4.22 Estructura de un ribosoma eucarionte. Cada ribosoma está formado por una subunidad grande y otra pequeña, que se unen cuando llega el RNA mensajero y comienza la síntesis de proteínas. La subunidad grande de un ribosoma eucarionte está integrada por unas 45 proteínas diferentes y tres moléculas de RNA. La subunidad pequeña tiene unas 33 proteínas y una molécula de RNA. El ribosoma eucarionte, una vez ensamblado, tiene un diámetro de unos 30 nm. Los ribosomas y las subunidades ribosómicas de las eubacterias y las arqueas son algo menores y presentan su propia dotación de proteínas y moléculas de RNA.

también presentes en los cloroplastos y en las mitocondrias, donde intervienen en la síntesis proteica específica de dichos orgánulos. Aquí difieren también en tamaño y composición de los ribosomas del citoplasma de las mismas células, si bien son muy similares a los encontrados en las bacterias y cianobacterias. Esta similitud es particularmente manifiesta cuando se comparan las secuencias del RNA ribosómico (rRNA) de mitocondrias y cloroplastos con las de los procariotas. Esto no es sino una prueba más del origen endosimbionte de las mitocondrias y los cloroplastos.

El citoplasma de las células eucariontes está formado por el citosol y el citoesqueleto

El **citoplasma** de una célula eucarionte es la parte del interior celular no ocupada por el núcleo. Por tanto, el citoplasma incluye orgánulos, tales como la mitocondria; también comprende al **citosol**, la sustancia semifluida en la cual están suspendidos los orgánulos. En una célula animal típica, el citosol ocupa más de la mitad de su volumen. En el citosol tienen lugar muchas actividades celulares, como la síntesis de proteínas, la síntesis de lípidos y las etapas iniciales de la obtención de energía a partir de azúcares.

En los albores de la biología celular, el citosol se consideraba como una sustancia amorfa, de consistencia de gel y se pensó que sus proteínas eran solubles y difundían libremente. Los avances técnicos han ido cambiando, considerablemente, esta visión inicial. Hoy día sabemos que el citosol de las células eucariontes lejos de ser un fluido sin estructurar, está penetrado por una intrincada red tridimensional de filamentos y túbulos interconectados, denominados **citoesqueleto** (Figura 4.23). El citoesqueleto es una red de microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios, todos ellos exclusivos de eucarióticas (*véase* Tabla 4.1).

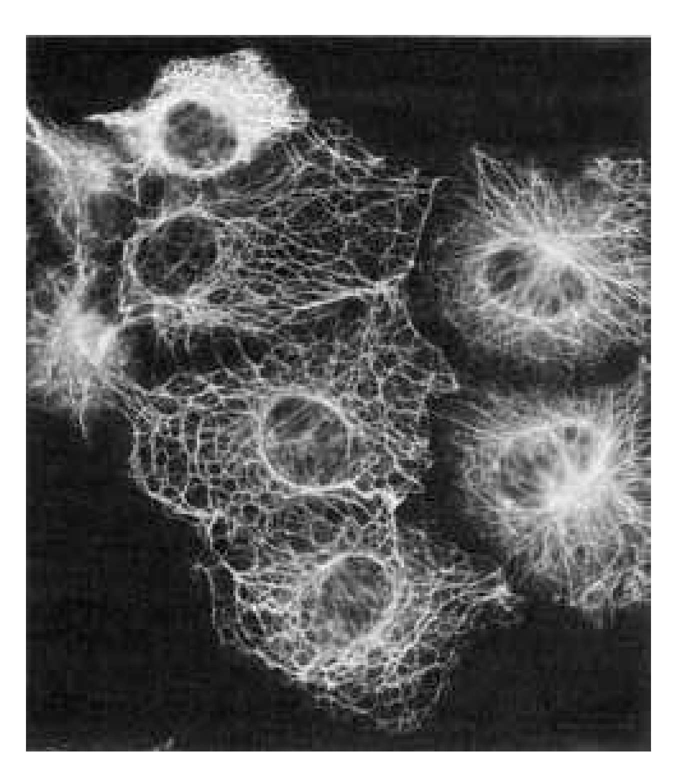


Figura 4.23 Citoesqueleto. El citoesqueleto está formado por una red de túbulos y filamentos que dan forma a la célula, anclan y dirigen los movimientos de los orgánulos y permiten que la célula, en su conjunto, se desplace o cambie de forma. La micrografía muestra e citoesqueleto de una célula del epitelio amniótico humano, teñida por técnicas de inmunofluorescencia, usando anticuerpos contra las queratinas, que son proteínas de los filamentos intermedios del citoesqueleto. Obsérvese que los filamentos rodean, pero no penetran, el espacio ocupado por el núcleo.

Como sugiere en nombre, el citoesqueleto es un armazón interno que confiere a la célula su forma característica y su elevado nivel de organización interna. Este conjunto elaborado de filamentos y túbulos forma una matriz muy estructurada, pero a la vez dinámica, que no sólo ayuda al establecimiento y mantenimiento de la forma, sino que también desempeña un papel central en el movimiento y la división celular. Como veremos en capítulos sucesivos, los filamentos y los túbulos que constituyen el citoesqueleto, intervienen en la contracción de las células musculares, el batimiento de cilios y flagelos, el movimiento de cromosomas durante la división celular y, en algunos casos, la locomoción de la propia célula.

El citoesqueleto sirve también como soporte para la localización y el movimiento de orgánulos dentro de citosol y, puede hacer lo mismo con relación a los ribosomas y las enzimas. Algunos investigadores estiman que, hasta un 80% de las proteínas del citosol no difunden libremente, sino que están asociadas al citoesqueleto. Incluso el agua, que significa aproximadamente el 70% del volumen celular, puede estar influida por el citoesqueleto. Se estima que entre el 20-40% del agua de citosol está atrapada por los filamentos y los túbulos.

Los tres elementos estructurales más importantes del citoesqueleto son los *microtúbulos*, los *microfilamentos* y los *filamentos intermedios*. Se pueden observar por microscopía de contraste de fases, inmunofluorescencia y microscopía electrónica. Algunas de las estructuras en las que están presentes (como los cilios, los flagelos o las fibrillas musculares) pueden verse incluso con el microscopio óptico ordinario. Los microfilamentos y los microtúbulos se conocen, especialmente, por su papel en la contracción y en el movimiento. De hecho, esas funciones se conocían bien, incluso antes de ser relacionados con la red de túbulos y filamentos que da a la célula su forma y estructura características.

En el Capítulo 15 se describirá detalladamente el citoesqueleto y en el Capítulo 16 se discutirá el papel de los microtúbulos y los filamentos en la contracción y en la motilidad. Volveremos a encontrarnos de nuevo a los microtúbulos y los microfilamentos en el Capítulo 19, en sus respectivos papeles en la separación de los cromosomas y la división celular. Aquí sólo comentaremos las características estructurales de los tres principales componentes del citoesqueleto: microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios.

Microtúbulos. Los **microtúbulos** (**MTs**) son los elementos estructurales de mayor tamaño del citoesqueleto. Una estructura bien conocida, constituida por MTs, es el *axonema* de cilios y flagelos, los apéndices responsables de movimientos en células eucariontes. Ya hemos visto un ejemplo de esta estructura, el axonema de la cola de los espermatozoides de la Figura 4.12 está formado por microtúbulos. Los MTs constituyen también las *fibras del huso* que separan a los cromosomas durante la división celular, como veremos en el Capítulo 19.

Además de su intervención en la motilidad celular y de los cromosomas, los MTs son también importantes en la organización del citoplasma. Contribuyen a la forma general de la célula, la disposición espacial de sus orgánulos, y la distribución de los microfilamentos y los filamentos intermedios. Como ejemplo de los diversos fenómenos dirigidos por los MTs, podemos citar las formas asimétricas de las células animales, el plano de división celular de las células vegetales, la disposición ordenada de los filamentos durante el desarrollo del músculo y la posición de las mitocondrias alrededor del axonema de apéndices móviles.

Como se ve en la Figura 4.24a, los MTs son cilindros huecos de un diámetro externo de unos 25 nm e interno de unos 15 nm. Aunque los microtúbulos suelen dibujarse como si fueran rectos y rígidos, la videomicroscopía pone de manifiesto que son bastante flexibles en las células vivas. La pared del microtúbulo está formada por tiras de *protofilamentos*, generalmente 13, distribuidos lado con lado alrededor del agujero central o *lumen*. Cada protofilamento es un polímero lineal de moléculas de *tubulina*. La tubulina es una proteína dimérica, formada por dos subunidades polipeptídicas similares, *tubulina-*α y *tubulina-*β. Todos los dímeros de cada uno de los protofilamentos se orientan en el mismo sentido, es decir, todas las subunidades miran hacia el mismo extremo del microtúbulo. Esta orientación uniforme confiere al MT una *polaridad* inherente. Como veremos en el Capítulo 15, la polaridad de los microtúbulos tiene consecuencias importantes en su ensamblaje y en la direccionalidad de los movimientos de orgánulos provistos de membrana.

Microfilamentos. Los **microfilamentos** (**MFs**) son mucho más delgados que los microtúbulos. Tienen un diámetro de unos 7 nm, por lo que son los elementos más pequeños del citoesqueleto. Los MFs se conocen especialmente por su papel en la contracción de las fibrillas musculares; volveremos a encontrarlas en el Capítulo 16. Pese a todo, los microfilamentos están también implicados en muchos otros fenómenos celulares. Pueden unirse a la membrana plasmática, influyendo en la locomoción, en el movimiento ameboide y en las corrientes citoplásmicas. Los MFs dan lugar también al estrangulamiento durante la telofase, que divide el citoplasma de las células animales, después de que los cromosomas se hayan separado, por acción de las fibras del huso acromático. Además, los MFs contribuyen a la configuración y mantenimiento de la forma celular.

Los MFs son polímeros de la proteína *actina* (Figura 4.24b). La actina se sintetiza en forma de monómero, denominado actina-G (G de globular). Los monómeros de actina-G polimerizan reversiblemente en largas cadenas de unos 4 nm de actina-F (F de filamentosa) (Figura 4.24b). Como los microtúbulos, los MFs son estructuras polarizadas; todas las subunidades se orientan en el mismo sentido. Esta polaridad afecta al sentido de elongación de los MFs; el ensamblaje se produce generalmente a mayor velocidad en uno de los extremos del microfilamento, mientras que el desensamblaje está favorecido en el otro extremo.

Filamentos intermedios. Los **filamentos intermedios** (**IFs**) son el tercer elemento estructural del citoesqueleto. Los IFs tienen un diámetro de unos 8-12 nm, mayor que el de los microfilamentos, pero menor que el de los microtúbulos. Los IFs son los más estables y los menos solubles de los constituyentes del citoesqueleto. Dada su estabilidad, muchos investigadores los consideran como el andamio que soporta la estructura del citoesqueleto. Se piensa que los filamentos intermedios confieren resistencia a la tensión, pues a menudo aparecen en áreas sometidas a estrés mecánico.

A diferencia de los microtúbulos y los microfilamentos, los filamentos intermedios difieren en su composición, según el tipo de tejido. En base a criterios bioquímicos e inmunológicos, los IFs de células animales se agrupan en seis clases. Cada tipo celular presenta, generalmente, sólo una, u ocasionalmente dos, clases de IFs. Gracias a esto, muchos tipos de células animales pueden distinguirse en base a los IFs que presente. Este *fenotipaje por filamentos intermedios*, sirve como herramienta de diagnóstico en la clínica.

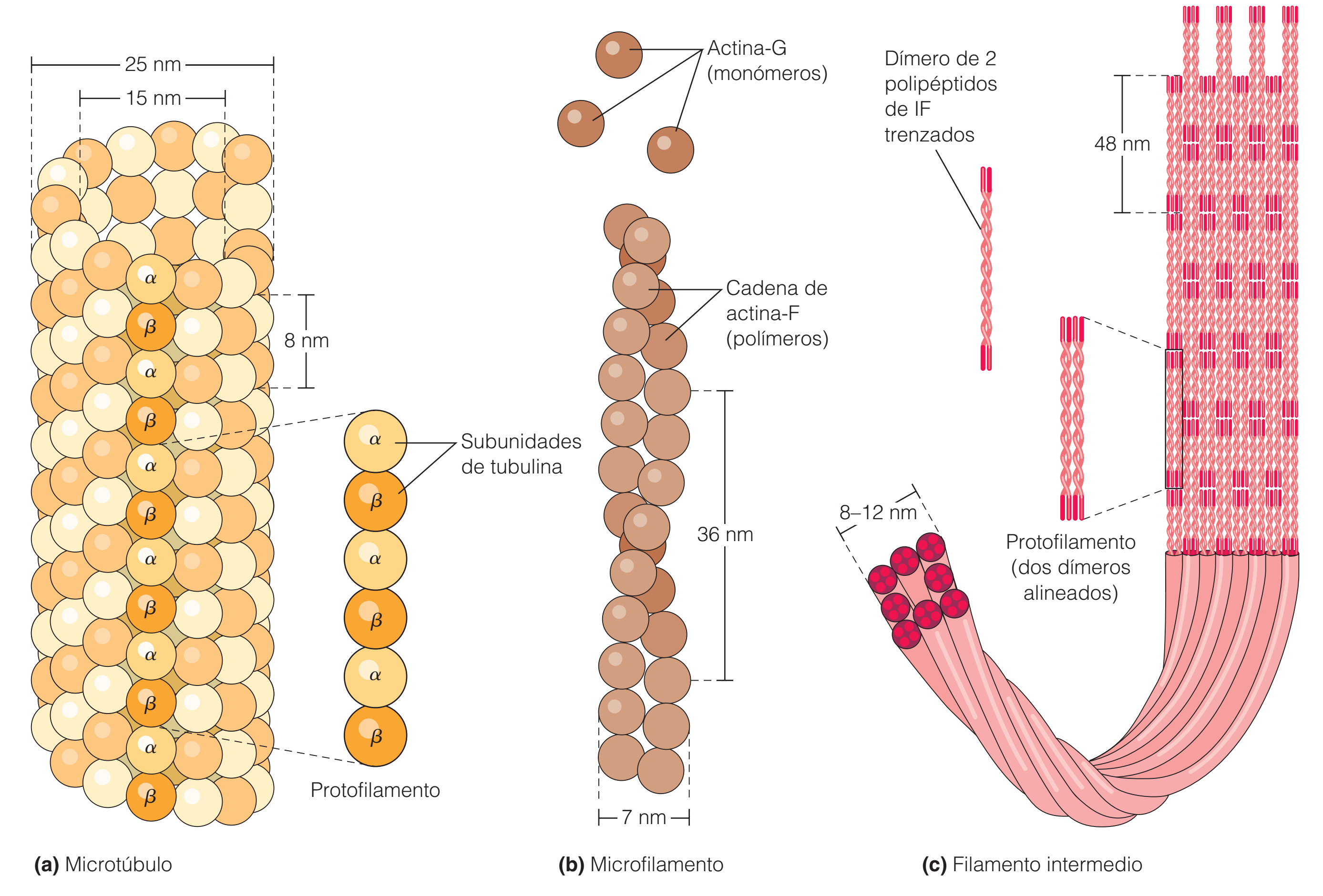


Figura 4.24 Estructuras de los microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios. (**a**) Diagrama de un microtúbulo con sus 13 protofilamentos dispuestos longitudinalmente para formar un cilindro hueco, de un diámetro externo de unos 25 nm y de un diámetro interno que unos 15 nm. Cada protofilamento es un polímero de dímeros de tubulina, cada uno de los cuales mide unos 8 nm de longitud. Todos los dímeros se orientan en la misma dirección lo que condiciona la polaridad del microtúbulo. (**b**) Esquema de un microfilamento que muestra una hebra de actina-F, enrollada en una estructura helicoidal con un diámetro de unos 7 nm. Cada 36 nm se produce media vuelta de hélice. Los polímeros de actina-F están formados por monómeros de actina-G, orientados todos ellos en la misma dirección confiriendo al microfilamento su polaridad inherente. (**c**) Esquema de un filamento intermedio. La unidad estructural es el protofilamento tetramérico, formado por dos pares de polipéptidos enrollados, de una longitud de unos 48 nm. Los filamentos se ensamblan por sus extremos y también lateralmente, dando lugar a un filamento intermedio de unos 8-12 nm y que se supone está formado por ocho protofilamentos.

A pesar de la heterogeneidad de tamaño y propiedades químicas, todos los IFs comparten características estructurales comunes. Todos tienen un segmento central en forma de varilla, particularmente parecido de unos IFs a otros. Flanqueando la región central de la proteína, están los extremos N-terminal y C-terminal, que difieren considerablemente en tamaño y secuencia, siendo, por tanto, los presuntos responsables de la diversidad de estas proteínas.

Se han propuesto multitud de modelos para la estructura de los IFs. Uno de los posibles se muestra en la Figura 4.24c. La unidad estructural básica es un dímero de los polipéptidos IF enlazados. Dos de esos dímeros se alinean lateralmente formando los *protofilamentos* tetraméricos. A su vez, los protofilamentos interaccionan unos con otros formando un filamento intermedio que, se cree tiene un grosor de ocho protofilamentos en todas sus regiones; probablemente los protofilamentos se solapan por los extremos.

La matriz extracelular y la pared vegetal son el «exterior» de la célula

Hasta aquí, hemos considerado la membrana plasmática, que rodea a todas las células, el núcleo, el citoplasma y un conjunto de orgánulos, sistemas de membrana, ribosomas, túbulos y filamentos propios del citoplasma de la mayoría de las células eucariontes. Aunque parezca que nuestra excursión se ha completado, la mayoría de las células se caracterizan también por las estructuras extracelulares que se forman por los materiales que las células exportan a través de la membrana plasmática. En las células animales, esas estructuras se denominan en su conjunto, **matriz extracelular** (**ECM**), que está constituida básicamente por fibras de colágeno y proteoglicanos. En las células vegetales, la estructura extracelular es una **pared celular** rígida, formada principalmente por *microfibrillas de celulosa* embebidas en

una matriz de otros polisacáridos y pequeñas cantidades de proteínas.

Las diferencias entre las células animales y las vegetales, son un reflejo de los distintos tipos de vida de estos dos amplios grupos de eucariotas. Los vegetales son generalmente *inmóviles*, lo cual es compatible con la rigidez de sus paredes vegetales. Los animales, por otra parte, casi siempre son *móviles*, característica ésta esencial para un organismo que necesita, no sólo buscar la comida, sino evitar convertirse en comida de otros organismos. En consonancia, sus células no están encerradas en paredes rígidas, sino rodeadas por una red relativamente elástica de fibras de colágeno

La ECM de las células animales da lugar a diferentes tipos de estructuras, dependiendo del tipo celular. La función primordial de la ECM es la de soporte, pero los diferentes tipos de materiales extracelulares y la forma en la que se disponen en la matriz, pueden condicionar otros procesos tan diversos como la motilidad celular y migración, la división celular, el reconocimiento y adhesión, y la diferenciación durante el desarrollo embrionario. El principal constituyente de la matriz extracelular animal son las fibras de colágeno y la red de proteoglicanos que las rodean. El término colágeno engloba a un grupo de glicoproteínas, generalmente insolubles, que contienen elevadas cantidades de glicina y de las formas hidroxiladas de lisina y prolina. En los vertebrados, el colágeno es una parte fundamental de los tendones, cartílagos y hueso, de suerte que es la proteína más abundante del cuerpo.

La Figura 4.25 ilustra la pared celular de una célula vegetal típica. Aunque no se observa en la figura, realmente hay dos tipos de paredes celulares. La que queda hacia el interior durante la división celular, es la denominada **pared celular primaria**, formada principalmente por fibrillas de celulosa embebidas en una matriz de polisacáridos con consistencia de gel. Las paredes primarias son bastante flexibles y extensibles, facilitando la expansión requerida para el crecimiento celular. Conforme la célula alcanza su tamaño y forma finales, se forma una **pared secundaria** más rígida, gracias a la deposición de nuevos constituyentes, dispuestos por dentro de la pared primaria. La pared secundaria suele tener más celulosa que la primaria y puede contener también *lignina*, el componente principal de la madera. La deposición de la pared secundaria hace que la célula sea poco extensible, determinando así su tamaño final y forma definitiva.

Las células vegetales vecinas, aunque separadas por las paredes, están realmente conectadas por numerosos puentes citoplásmicos denominados **plasmodesmos**, que atraviesan toda la pared celular. Las membranas plasmáticas de las células adyacentes son continuas a través de cada plasmodesmo, de manera que cada canal está limitado por cada membrana. El diámetro de un plasmodesmo típico es lo suficientemente grande para permitir el paso, sin restricciones, de agua y solutos pequeños, de una célula a otra.

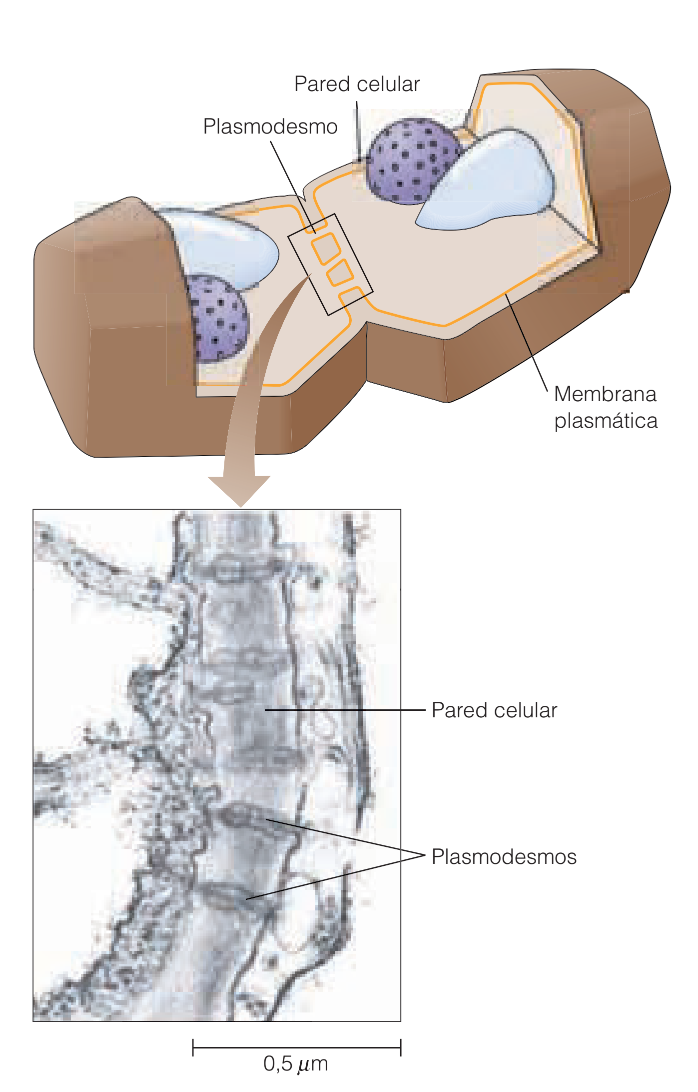


Figura 4.25 Pared celular vegetal. La pared que rodea a una célula vegetal está formada por microfibrillas rígidas de celulosa embebidas en una matriz no celulósica de proteínas y polímeros de azúcares. Obsérvese que las células adyacentes están conectadas por plasmodesmos.

La mayoría de las células del vegetal están interconectadas de esta forma.

Las células animales también pueden comunicarse unas con otras. Pero en lugar de plasmodesmos, tienen uniones intracelulares denominadas **comunicantes** o en hendidura («gap junctions»), especializadas en la trasferencia de sustancias entre los citoplasmas de células adyacentes. Existen otros dos tipos de uniones entre células animales. Las **uniones estrechas** mantienen a las células tan unidas, que el transporte de sustancias a través de los espacios intracelulares, queda bloqueado. Las **uniones adhesivas** también unen células adyacentes, con el propósito de que formen láminas de tejido estables, pero a la vez flexibles. Cada uno de estos tipos de unión se estudiará con detalle en el Capítulo 17.

La mayoría de los procariotas tienen también una estructura extracelular denominada pared celular. Sin em-

bargo, la pared bacteriana no está formada por celulosa, sino por peptidoglicanos. Los peptidoglicanos están formados por unidades repetitivas de N-acetilglucosamina (GlcNac) y N-acetilmurámico (MurNac), aminoazúcares que ya vimos en el Capítulo 3 (*véase* la Figura 3.26). Además, las paredes celulares bacterianas tienen otros componentes, algunos de los cuales son exclusivos de determinados grupos de bacterias. La presencia o ausencia de éstos se manifiesta por su respuesta a la *tinción de Gram*, denominada así como tributo a Hans Christian Gram, el bacteriólogo danés que la inventó. Las bacterias se tiñen con una solución de violeta cristal y yodo, decolorándose posteriormente con alcohol o acetona. Las células gram-positivas resisten a la decoloración mientras que las gram-negativas, no.

Entre los constituyentes de la pared celular específicos de las bacterias gram-negativas, hay lipopolisacáridos y lipoproteínas. Los principales compuestos presentes sólo en las bacterias gram-positivas son los ácidos teicoicos, formados por alcoholes de tres o cinco átomos de carbono (glicerol y ribitol, respectivamente) unidos entre sí por grupos fosfato.

Virus, viroides y priones: agentes que invaden células

Antes de terminar nuestra visión inicial de la biología celular, nos detendremos en varios grupos de agentes que invaden a las células, alterando su función y a menudo matando a sus huéspedes. En esta categoría se encuentran los virus y otros dos organismos mucho menos conocidos, los viroides y los priones.

Un virus está formado por un núcleo de DNA o RNA, rodeado por una cubierta proteica

Los **virus** son parásitos subcelulares incapaces de sobrevivir por sí solos. En lugar de ello, tienen que invadir e infectar células, cuya maquinaria sintética reconducen hacia la producción de más virus. Los virus no pueden llevar a cabo todas las funciones necesarias para una vida independiente y, por tanto, dependen, para la mayoría de sus necesidades, de las células a las que invaden.

Son responsables de muchas enfermedades en el hombre, animales y plantas y son, por tanto, importantes por derecho propio. Son además herramientas de investigación muy útiles para biólogos celulares y moleculares, ya que son mucho menos complicados que las células. El *virus del mosaico del tabaco (TMV)* que vimos en el Capítulo 2 (*véanse* Figuras 2.20 y 2.21) es un buen ejemplo de un virus importante económica y científicamente; económicamente, porque arruina al tabaco y otros cultivos a los que infecta, y científicamente, porque es muy apropiado para el trabajo de laboratorio. Los estudios de Fraenkel-Conrat acerca del autoensamblaje del TMV, descritos en el Capítulo 2 ilustran la utilidad de los virus para los biólogos celulares.

Los virus son algunas veces denominados por las enfermedades que causan. El virus de la polio, el virus de la gripe, el herpes símplex y el TMV son buenos ejemplos. Otros virus han recibido nombres de laboratorio más crípticos (como T4, Qβ, λ o el virus de Epstein-Barr). Aquellos que infectan a las bacterias, se denominan **bacteriófagos** o, abreviando, simplemente **fagos**. Los bacteriófagos y otros virus serán protagonistas en nuestra discusión sobre genética molecular en los Capítulos 18-23, gracias a las profundas similitudes genéticas entre virus y células.

El tamaño de los virus varía en el rango de 25 a 300 nm. Los más pequeños tienen, por tanto, las dimensiones de un ribosoma, mientras que los mayores son casi un cuarto del diámetro de una bacteria. Cada virus tiene su forma característica, como se observa en la Figura 4.26.

Pese a su diversidad morfológica, los virus son bastante simples, desde el punto de vista químico. La mayoría no tienen más que una cubierta (o cápsida) proteica que rodea a un núcleo formado por una o más moléculas de, bien RNA, bien DNA, dependiendo del tipo de virus. Los virus más simples, como el TMV, tienen una sola molécula de ácido nucleico rodeada por una cápsida de una única proteína (*véase* Figura 2.20). Los más complejos presentan núcleos con varias moléculas de ácidos nucleicos y cápsidas formadas por unas cuantas (o incluso muchas) proteínas diferentes. Algunos virus se rodean incluso de una membrana, que deriva de la membrana plasmática de la célula huésped en la cual las partículas virales se formaron y ensamblaron. Estos virus se denominan *virus cubiertos*; el virus de la inmunodeficiencia humana, que causa el SIDA, es un ejemplo de ellos.

Una pregunta difícil de contestar es si los virus viven o no. La respuesta depende de lo que se considere por «vida» y, probablemente sea más útil tomarla sólo como algo que nos ayuda a entender qué son y qué no son los virus. Las propiedades esenciales de los seres vivos son el *metabolismo* (reacciones celulares organizadas en rutas coherentes), la *irritabilidad* (la percepción de y respuesta a estímulos ambientales) y la *capacidad de reproducción.* Los virus no satisfacen, claramente, los dos primeros criterios. Fuera de las células que los hospedan, los virus son inertes e inactivos. De hecho, se pueden aislar y cristalizar casi como un constituyente químico. Los virus son funcionales solamente en las células huésped apropiadas, en las que desarrollan un ciclo de síntesis y ensamblaje que produce más virus.

Incluso la capacidad de los virus para reproducirse debe ser considerada con cautela. Un pilar básico de la teoría celular es que las células se forman sólo a partir de células preexistentes, lo cual no es cierto en los virus. Ningún virus puede dar lugar a otro virus por un proceso de autoduplicación. En realidad, el virus debe subvertir las maquinarias metabólica y genética de la célula huésped, reprogramándolas para sintetizar las proteínas necesarias que

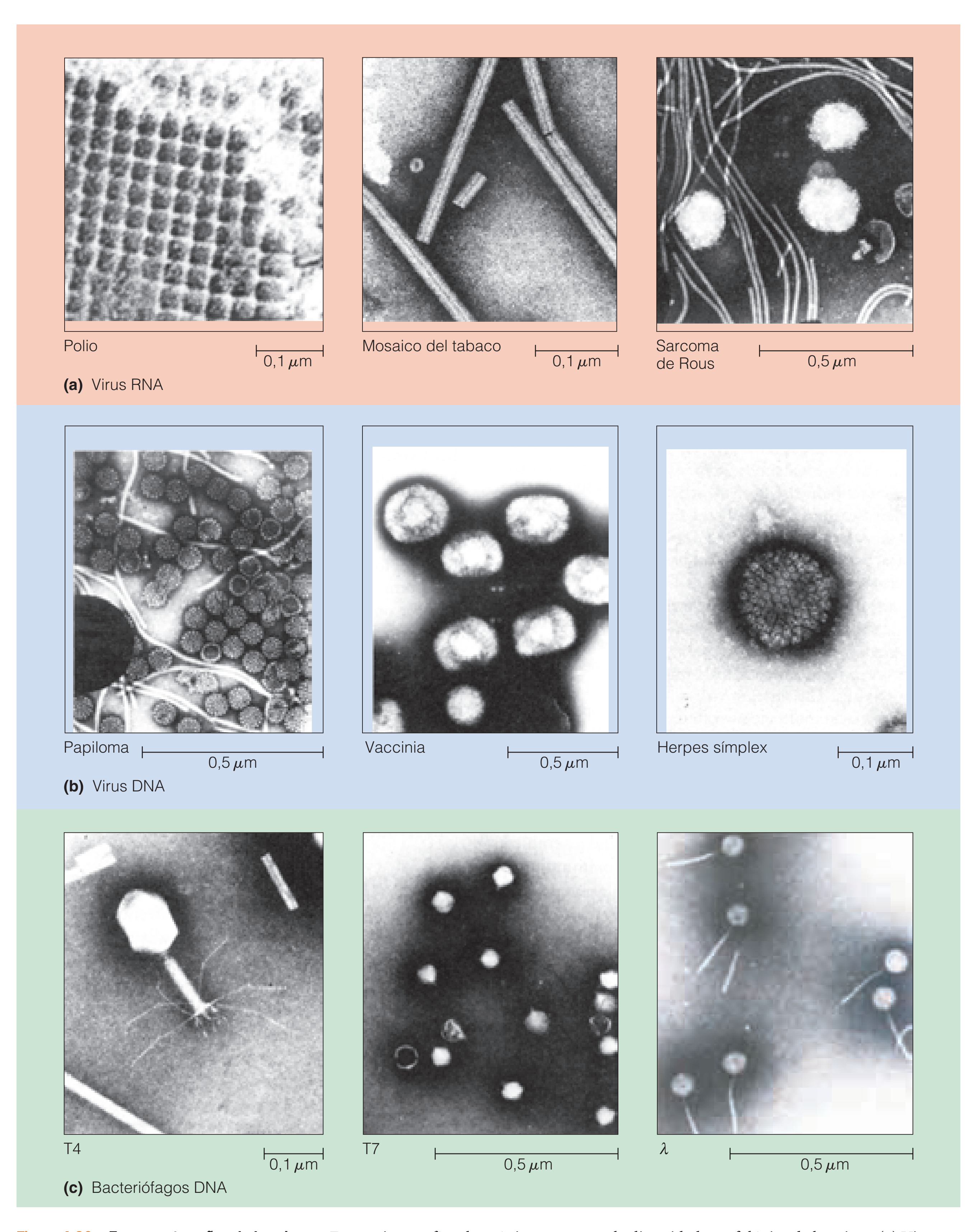


Figura 4.26 **Formas y tamaños de los virus.** Estas micrografías electrónicas muestran la diversidad morfológica de los virus. (**a**) Virus de tipo RNA (de izquierda a derecha): virus de la polio, del mosaico del tabaco y del sarcoma de Rous. (**b**) Virus de tipo DNA: papiloma, vaccinia y herpes símplex. (**c**) Bacteriófagos de tipo DNA: T4, T7 y λ (todos TEM).

empaquetan a las moléculas de DNA o RNA; estas últimas, a su vez, se han formado previamente, copiando la información genética del virus inicial.

Por tanto, solamente podemos pensar en términos genéticos, que un virus es algo vivo. Otra propiedad fundamental de los seres vivos es la capacidad para especificar la composición genética de la progenie, algo que los virus poseen claramente. Así pues, probablemente es más útil pensar en los virus como entes «cuasi-vivos», coincidiendo en cierta medida, pero no del todo, con la definición básica de la vida.

Los viroides son pequeñas moléculas circulares de RNA

Por muy simples que sean los virus, existen agentes incluso más simples, capaces de infectar a células eucariontes (pero no a las procariontes, que se sepa hasta hoy). Los viroides encontrados en algunas células vegetales pertenecen a esta categoría. Son moléculas circulares de RNA, de tan sólo unos 300-400 nucleótidos de longitud, que se replican en las células huésped pese a que no codifican ninguna proteína.

No se conoce cómo se transmiten los viroides de una célula huésped a otra, ya que no existen, aparentemente, como formas libres. Lo más plausible es que pasen de una célula vegetal a otra sólo cuando las superficies de las células adyacentes están dañadas y, por tanto, no existe barrera para el transvase del RNA.

Los viroides son responsables de enfermedades en varias especies vegetales de cultivo, como las patatas y el tabaco. Una patología viroide de graves consecuencias económicas es la enfermedad de los cocoteros conocida como *cadang-cadang* (palabra originaria de Filipinas que significa muerte lenta, n. del t.). No se sabe aún cómo causan la enfermedad los viroides. Puede que entren en el núcleo e interfieran con la transcripción del DNA a RNA, pero también podrían alterar los mecanismos de procesamiento requeridos por la mayor parte de los RNAs transcritos en las células eucariontes.

Los priones son «partículas proteicas infecciosas»

Los **priones** representan a una clase más de agentes infecciosos de los que se conoce muy poco. El término fue acuñado para describir a las *partículas proteicas infecciosas* (en inglés, *prion* es el acrónimo de ***pro**teinaceous **in**fective particles*, con el orden de letras ligeramente cambiado; n. del t.), que se piensa son responsables de alteraciones neurológicas tales como el «scrapie» en ovejas y cabras, el «kuru» en el hombre y la enfermedad de las «vacas locas» en el ganado vacuno. El *scrapie* recibe ese nombre porque los animales infectados están frotándose constantemente contra árboles u otros objetos, perdiendo («scraping off») la mayor parte de la lana. El *kuru* es una enfermedad degenerativa del sistema nervioso central, descrita originariamente entre los nativos de Nueva Guinea. Los afectados por ésta u otras patologías basadas en priones, padecen inicialmente de flojera física y demencia leve, pero los efectos se van agravando progresivamente, convirtiéndose al final en fatales. La enfermedad de las «*vacas locas*» se detalla en el Anexo 22A (p. 761).

Las partículas proteicas a las cuales hace referencia su nombre, son los únicos agentes que han sido aislados hasta la fecha de los individuos infectados. La creencia común actual es que las proteínas de los priones son versiones plegadas anómalamente de proteínas normales. Tanto las formas normales, como las variantes de las proteínas priónicas aparecen en la superficie de las neuronas, sugiriendo que pueden afectar de alguna forma a los receptores que detectan las señales nerviosas.

Perspectiva

Una separación fundamental en biología es la que tiene lugar entre los procariotas (eubacterias y arqueas) y los eucariotas (animales, vegetales superiores, hongos y protistas). Lo mismo ocurre en relación a las eubacterias y las arqueas. De hecho, el análisis de las secuencias de los RNAs ribosómicos y otros datos moleculares, sugieren una concepción tripartita de los organismos, con eucariotas, eubacterias y arqueas, como los tres grupos principales.

Las únicas características estructurales comunes a los tres grupos son la membrana plasmática y los ribosomas. El resto de orgánulos sólo aparecen en células eucariontes, en las que permiten la imprescindible compartimentación de funciones. Las células procariontes son relativamente pequeñas y estructuralmente menos complejas que las eucariontes, careciendo de la mayor parte de los sistemas internos de membrana y orgánulos.

Las células eucariontes tienen, por lo menos, cuatro características estructurales principales: una membrana plasmática que define los límites de la célula y retiene sus contenidos, un núcleo que alberga la mayor parte del DNA celular, un conjunto de orgánulos y el citosol, con su citoesqueleto de túbulos y filamentos. Además, las células vegetales casi siempre tienen una pared celular rígida, mientras que las animales están generalmente rodeadas por una matriz extracelular de colágeno y proteoglicanos.

El núcleo está limitado por una membrana doble, denominada envuelta nuclear. Los cromosomas del núcleo representan la mayoría del DNA celular, asociado con proteínas.

Las mitocondrias intervienen en la oxidación de las moléculas nutricias que liberan energía, utilizada para fabricar ATP. Los cloroplastos captan la energía solar, que emplean para «fijar» el carbono (transformarlo en la forma orgánica) a partir del dióxido de carbono, que lo con-

vierten en azúcar. Las mitocondrias y los cloroplastos están rodeados por una membrana doble, con un sistema interno de membranas complejo, en el cual residen la mayoría de los componentes implicados en la generación del ATP.

El retículo endoplásmico es una red profusa de membranas, que puede ser rugosa (salpicada con ribosomas) o lisa. El RE rugoso es el encargado de la síntesis de proteínas de secreción y de membrana, mientras que el RE liso interviene en la síntesis de lípidos y en la detoxificación de drogas. Las proteínas sintetizadas en el RE continúan su procesamiento y empaquetamiento en el complejo de Golgi, siendo finalmente transportadas hacia la superficie celular, por medio de vesículas de secreción.

Los lisosomas contienen enzimas hidrolíticas y están implicados en la digestión celular. Fueron los primeros orgánulos en ser descubiertos en base a su función, más que a su morfología.

Los peroxisomas suelen ser del mismo tamaño que los lisosomas, pero intervienen en la generación y degradación del peróxido de hidrógeno. Los peroxisomas animales desempeñan una función esencial en el catabolismo de ácidos grasos de cadena larga. En los vegetales, ciertos peroxisomas están implicados en la conversión de lípidos de almacenamiento en hidratos de carbono, siendo esenciales durante la germinación de las semillas y en el proceso de la fotorrespiración.

Los ribosomas son los lugares de síntesis proteica, tanto en las células procariontes, como en las eucariontes, así como en las mitocondrias y cloroplastos. Las estrechas similitudes entre los ribosomas de mitocondrias y cloroplastos, por un lado, y los de bacterias y cianobacterias por otro, han permitido enunciar la teoría endosimbiótica, que propone que estos orgánulos derivan de células procariontes.

El citoesqueleto es una red extensa de microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios, que confieren a las células sus formas características. Interviene además en la motilidad y contractilidad celulares.

Los virus satisfacen algunos, aunque no todos los criterios de los seres vivos. Son importantes, tanto como agentes infecciosos que causan enfermedades en el hombre, los animales y las plantas, como herramientas de laboratorio, especialmente para los genetistas. Los viroides y los priones son agentes infecciosos incluso menores (y peor comprendidos) que los virus. Los viroides son moléculas pequeñas de RNA y se supone que los priones son productos anormales de genes celulares normales.

Problemas

Los problemas de mayor dificultad están marcados con un •.

4.1 Procariotas y eucariotas. Señale cuáles de los siguientes enunciados son verdaderos (V) o falsos (F). En los falsos, cambiar la frase para hacerla cierta.

(a) La mayoría de las células eucariontes son más grandes que las procariontes.

(b) Algunas células son lo suficientemente grandes para ser observables a simple vista.

(c) Las células procariontes carecen de los siguientes elementos: mitocondrias, núcleo rodeado de membrana, membrana plasmática y microtúbulos.

(d) La relación área/volumen es generalmente mayor en las células procariontes que en las eucariontes.

(e) Los ribosomas mitocondriales de las células musculares se parecen más a los de las bacterias del intestino que a los del citosol de las mismas células musculares.

(f) Dado que los procariotas no tienen ni mitocondrias ni cloroplastos, no pueden llevar a cabo ni la síntesis de ATP, ni la fotosíntesis.

4.2 Especializaciones celulares. Cada uno de los tipos celulares listados más abajo es un buen ejemplo de especialización funcional. Unir las células de la columna A con lasfunciones apropiadas de la columna B, explicando la elección.

Lista A	Lista B
(a) Célula pancreática	División celular
(b) Célula del músculo del vuelo	Absorción
(c) Célula del parénquima en empalizada	Movimiento
(d) Célula del borde intestinal	Fotosíntesis
(e) Célula nerviosa	Secreción
(f) Célula bacteriana	Transmisión de impulsos eléctricos

4.3 Estructuras celulares. Indique cuáles de las siguientes estructuras o componentes celulares aparecen en células animales (A), en bacterias (B) y/o en células vegetales (V).

(a) Cloroplastos
(b) Pared celular
(c) Microtúbulos
(d) DNA
(e) Envuelta nuclear
(f) Nucleolo
(g) Complejo de Golgi
(h) Vacuola central
(i) Tilacoides
(j) Ribosomas
(k) Bicapas lipídicas
(l) Actina

4.4 Complete las frases. Complete cada uno de los siguientes enunciados sobre estructura celular, con diez palabras como máximo.

(a) Si se le enseña una micrografía electrónica de un corte de una célula y se le pide que identifique si es vegetal o animal, una cosa que podría hacer es...

(b) Una lámina de patata sumergida en una solución concentrada de azúcar se...

(c) Una estructura celular que es visible con el microscopio electrónico, pero no con el óptico es...

(d) Algunos de los medios en los que es más probable encontrar arqueas que eubacterias son...

(e) Una de las razones por las que puede ser difícil separar lisosomas de peroxisomas por métodos de centrifugación es que...

4.5 Buscando las diferencias. Sugiera una forma para distinguir entre los pares propuestos:

(a) Células bacterianas y protistas del mismo tamaño.

(b) Retículo endoplásmico rugoso y liso.

(c) Peroxisomas animales y foliares.

(d) Virus y viroide.

(e) Endosomas tardíos y lisosomas.

(f) Microfilamentos y filamentos intermedios.

(g) Virus de la polio y herpes símplex.

(h) Ribosomas eucarióticos y procarióticos.

(i) Ribosomas eucarióticos y de arqueas.

4.6 Relaciones entre estructuras. Para cada par de los elementos relacionados, señálese con una A, si el primero es un constituyente del segundo, con una B, si el segundo es parte de primero y con una N, si las estructuras no guardan una relación particular entre sí.

(a) Mitocondria; cresta.

(b) Complejo de Golgi; núcleo.

(c) Citoplasma; citoesqueleto.

(d) Pared celular; matriz extracelular.

(e) Nucleolo; núcleo.

(f) RE liso; ribosoma.

(g) Bicapa lipídica; membrana plasmática.

(h) Peroxisoma; tilacoide.

(i) Cloroplasto; granum.

•**4.7 Síntesis de proteínas y secreción.** Pese a que no trataremos en detalle la síntesis de proteínas y la secreción hasta capítulos más avanzados, usted dispone ya de información suficiente sobre esos procesos, para ordenar los 7 eventos que se listan al azar a continuación. Ordénelos del 1 al 7 de manera que representen la secuencia correcta de los pasos a-g, siguiendo una proteína de secreción típica desde el inicio de la transcripción (lectura) de la información genética del núcleo, hasta la secreción de la proteína por exocitosis.

Transcripción → (a) → (b) → (c) →
(d) → (e) → (f) → (g) → Secreción

(1) La proteína se glicosila parcialmente en la luz del RE.

(2) La vesícula de secreción alcanza a la membrana y se fusiona con ella.

(3) El RNA transcrito se transporta del núcleo al citoplasma.

(4) Los grupos azucarados finales se añaden a la proteína en el complejo de Golgi.

(5) Conforme se sintetiza la proteína, va atravesando la membrana del RE, para acceder a la luz de una cisterna.

(6) La proteína se empaqueta en una vesícula de secreción que se libera desde el complejo de Golgi.

(7) El RNA mensajero se asocia con un ribosoma y comienza la síntesis de la proteína deseada, en la superficie del RE rugoso.

•**4.8 Patologías en el nivel de los orgánulos.** Cada uno de los siguientes problemas clínicos se debe a alteraciones en el funcionamiento de un orgánulo u otra estructura celular. Identifique en cada caso al orgánulo, indicando si se produce una disminución o aumento de la actividad.

(a) Una niña ingiere cianuro sin querer, falleciendo casi de inmediato, porque cesa la producción de ATP.

(b) Un niño es diagnosticado de adrenoleucodistrofia neonatal (NALD), que se caracteriza por la incapacidad de romper los ácidos grasos de cadena muy larga.

(c) Una fumadora desarrolla cáncer de pulmón y le explican que la causa está en que una población de sus células pulmonares está sometida a una tasa mitótica superior a la normal.

(d) Un joven descubre que su infertilidad es debida a la falta de motilidad de sus espermatozoides.

(e) Un pequeño fallece de la enfermedad de Tay-Sachs, porque sus células carecen de la hidrolasa que rompe un componente de la membrana denominado gangliósido G_{M2}, de manera que se acumula en las membranas de sus células cerebrales.

(f) Un niño es alimentado con una dieta sin lácteos, porque las células de la mucosa de su intestino delgado, no segregan la enzima necesaria para hidrolizar la lactosa, el disacárido presente en la leche.

•**4.9 La menor de las bacterias.** La «bacteria más pequeña» mencionada en la página 75 se denomina *micoplasma*. La mayoría de los micoplasmas tienen sólo unos 0,3 μm de diámetro, por lo que son considerados los organismos vivos más pequeños. Para apreciar lo pequeñas que son estas células, conteste a las siguientes preguntas (Nota: El volumen de una esfera y un cilindro son, respectivamente, $4\pi r^3/3$ y $\pi r^2 h$.)

(a) ¿Cuál es el volumen de un micoplasma en mililitros? ¿Qué significa esto con relación al volumen de *Escherichia coli*, una bacteria común del intestino, de forma cilíndrica y que mide 1 μm de diámetro y 2 μm de longitud?

(b) ¿Cuántos ribosomas cabrán en un micoplasma si en conjunto no ocupan más del 20% de la célula? Compare esto con los miles de ribosomas de *E. coli.*

(c) Asumiendo que la concentración de glucosa en un micoplasma es 1,0 m*M*, ¿cuántas moléculas de glucosa estarán presentes en la célula?

(d) La mayoría de los compuestos celulares están en concentraciones mucho más bajas que la glucosa. La concentración de NAD (dinucleótido de nicotinamida y adenina) en una célula bacteriana es, aproximadamente, 2 μm. ¿Cuántas moléculas de NAD están presentes en un micoplasma?

(e) La información genética de los micoplasmas está contenida en una única molécula de DNA, de una masa molecular de unos 2×10^7 y una circunferencia de unos 100 nm. ¿Qué proporción del peso total del micoplasma representa el DNA? (Asuma que la densidad de una célula de micoplasma es 1,1 g/cm^3.) ¿Qué problema, si hay alguno, puede representar para la célula la longitud de la molécula del DNA?

(f) En base a sus cálculos, ¿cuál es el factor que limita el menor tamaño posible de una célula?

•**4.10 La bacteria gigante.** En 1993, E.R. Angert y sus colaboradores publicaron un artículo titulado «La mayor bacteria» (*Nature* 362:239-241) en el que se describía el hallazgo de una bacteria, *Epulopiscium fishelsoni*, que llegaba a medir hasta

80 μm por 600 μm. En el resumen, los autores citaban que para demostrar que *E. fishelsoni* era una célula procarionte, «aislaron los genes codificantes del RNA de la subunidad pequeña del ribosoma... y lo utilizaron para un análisis filogenético».

(a) ¿Cuál es el valor de los genes que codifican el RNA ribosómico para este análisis filogenético?

(b) ¿Por qué sorprende el tamaño de esta bacteria?

(c) Asumiendo que la «mayor de las bacterias» tiene forma cilíndrica y mide 80 μm de diámetro y 600 μm de longitud, ¿cuántas células de *E. coli* (también cilíndrica y con un diámetro de 1μm y una longitud de 2 μm) cabrían en una de *E. fishelsoni*?

Bibliografía recomendada

Las referencias con importancia histórica están marcadas con •.

Referencias generales

Lehninger, A. L., D. L. Nelson, y M. M. Cox. *Principles of Biochemistry*, 3.ª edición. New York:Worth, 1999.

Lodish, H., A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore y J. Darnell.*Molecular Cell Biology*, 4th ed. New York: Scientific Books, 2000.

Células eucariontes y procariontes/eubacterias y arquea

Angert, E. R., K. D. Clements y N. R. Pace. The largest bacterium. *Nature* 362 (1993): 239.

Daniel, R. M. y D. A. Cowan. Biomolecular stability and life at high temperatures. *Cell.Mol. Life Sci.* 57 (2000): 250.

Gray, M.W. The third form of life. *Nature* 383 (1996): 299.

Gupta, R. S. y C. B. Golding. The origin of the eukaryotic cell. *Trends Biochem. Sci.* 21 (1996): 166.

Madigan, M. T. y B. L.Marrs. Extremophiles. *Sci. Amer.* 276 (April 1997): 82.

Peschek, G. A.,W. Löffelhardt y G. Schmetterer, eds. *The Phototrophic Prokaryotes.* New York: Kluwer Academic/ Plenum, 1999.

Sogin, M. L. Giants among the prokaryotes. *Nature* 362 (1993): 207.

Trotsenko, Y. A. y V. N. Khmelenina. Biology of extremophilic and extremotolerant methanotrophs. *Arch. Microbiol.* 177 (2002): 123.

•Vidal, G. The oldest eukaryotic cells. *Sci. Amer.* 244 (February 1984):48.

•Woese, C. R. y G. E. Fox. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74 (1977): 5088.

Woese, C. R., O. Kandler y M. L.Wheelis. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 87 (1990): 4576.

El núcleo

Hoffman, M. The cell's nucleus shapes up. *Science* 259 (1993): 1257.

Lamond, A. I. y W. C. Earnshaw. Structure and function in the nucleus. *Science* 280 (1998): 547.

Strouboulis, J. y A. P.Wolfe. Functional compartmentalization of the nucleus. *J. Cell Sci.* 109 (1996): 1991.

Orgánulos y enfermedades humanas

Gould, S. J. y D.Valle. Peroxisome biogenesis disorders: Genetics and cell biology. *Trends Genet.* 16 (2000): 340.

Grabowski, G. A. y R. J. Hopkins. Enzyme therapy for lysosomal storage diseases: Principles, practice, and prospects. *Annu. Rev. Genomics and Human Genetics* 4 (2003): 403.

Grossman, L. I. y E. A. Shoubridge.Mitochondrial genetics and human disease. *BioEssays* 18 (1996): 983.

Neufeld, E. F. Lysosomal storage diseases. *Annu. Rev. Biochem.* 60 (1991): 257.

Schon, E. A. Mitochondrial genetics and disease. *Trends Biochem. Sci.* 25 (2000): 555.

Smeitink, J., L. van den Heuvel y S. DiMauro. The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat. Rev.* 2 (2000): 342.

Wallace, D. C. Mitochondrial DNA in aging and disease. *Sci. Amer.* 277 (August 1997): 40.

Winchester, B., A.Vellodi y E. Young. The molecular basis of lysosomal storage diseases and their treatment. *Biochem. Soc. Trans.* 28 (2000): 150.

Membranas intracelulares y orgánulos

Allan,V. J., H. M. Thompson y M. A.McNiven.Motoring around the Golgi. *Nature Cell Biol.* 4 (2002): E236.

Balch,W. E., ed. *Molecular Mechanisms of Intracellular Vesicular Traffic.* San Diego: Academic Press, 2000.

Berger, E. G. y J. Roth, eds. *The Golgi Apparatus.* Boston: Birkhauser Verlag, 1997.

Cuervo, A. M. y J. F. Dice. Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *J.Mol.Med.* 76 (1998): 76.

•de Duve, C. The peroxisome in retrospect. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 804 (1996): 1.

Frey, T. G. y C. A. Mannella. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 25 (2000): 319.

Garrett, R. A., *et al.*, eds. *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics, and Cellular Interactions.*Washington, DC: ASM Press, 2000.

Glick, B. S. Organization of the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12 (2000): 450.

Granzier, H. L. y G. H. Pollack, eds. *Elastic Filaments of the Cell.* New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2000.

Green, R. y H. F. Noller. Ribosomes and translation. *Annu. Rev. Biochem.* 66 (1997): 679.

Leigh, R.A. y D. Sanders, eds. *The Plant Vacuole.* San Diego: Academic Press, 1997.

Moore, R. B. Ribosomes: protein synthesis in slow motion. *Curr. Biol.* 7 (1997): R179.

Ovadi, J. y P. A. Srere.Macromolecular compartmentation and channeling. *Internat. Rev. Cytol.* 192 (2000): 255.

Pon, L. A. y E. A. Schon, eds.*Mitochondria.* San Diego: Academic Press, 2001.

Reumann, S. The structural properties of plant peroxisomes and their metabolic significance.*Annu. Rev. Genetics* 34 (2000): 623.

•Sabatini, D. D. y G. E. Palade. Charting the secretory pathway. *Trends Cell Biol.* 9 (1999): 413.
Schettler, I. E. *Mitochondria.* New York:Wiley-Luss, 1999.
Spirin, A. S. *Ribosomes.* New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999.
Subramani, S. Components involved in peroxisome import, biogenesis, proliferation, turnover, and movement. *Physiol. Rev.* 78 (1998): 171.
Voeltz, G. K., M. M. Rolls y T. A. Rapoport. Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Reports* 3 (2002): 944.

Citoplasma y citoesqueleto

Carraway, K. L. y C. A. Carraway, eds. *Cytoskeleton: Signaling and Cell Regulation: A Practical Approach.* Oxford: Oxford University Press, 2000.
Drubin, D. y N. Hirokawa, eds. The cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, number 1 (1998).
Fowler,V. M. y R.Vale. The cytoskeleton: a collection of reviews. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, number 1 (1996).
Fuchs, E. y D.W. Cleveland. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* 279 (1998): 514.
Howard, J. *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton.* Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2001.
Nogales, E. Structural insights into microtubule function. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30 (2001): 277.
Strelkov, S.V., H. Herrmann y U. Aebi. Molecular architecture of intermediate filaments. *BioEssays* 25 (2003): 243.

Matriz extracelular y pared celular

Aumailley, M. y B. Gayraud. Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J.Mol.Med.* 76 (1998): 253.
Brett, C. T. Cellulose microfibrils in plants: Biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall. *Internat. Rev. Cytol.* 199 (2000): 161.
Cosgrove, D. J. Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.* 13 (1997): 171.
Ekblom, P. E. y R. Timpl, eds. Cell-to-cell contact and extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8 (1996): 599.
Kreis, T. y R.Vale, eds.*Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins,* 2nd ed.Oxford: Oxford University Press, 1999.
Sakai, L. Y. The extracellular matrix. *Sci.Med.* 2 (May 1995): 58.
Scott, J. E. Extracellular matrix, supramolecular organisation, and shape. *J. Anat.* 187 (1995): 259.

Virus, viroides y priones

•Aguzzi, A. y M. Polymenidou.Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell* 116 (2004): S109.
Aguzzi, A. y C.Weissmann. The prion's perplexing persistence. *Nature* 392 (1998): 763.
Balter, M.Viruses have many ways to become unwelcome guests. *Science* 280 (1998): 204.
Cann, A. J. *Principles of Molecular Virology*, 3rd ed. San Diego: Academic Press, 2001
Caughey, B.W. *Prion Proteins.* San Diego: Academic Press, 2001.
Diener, T. O. Origin and evolution of viroids and viroid-like satellite RNAs. *Virus Genet.* 11 (1995): 119.
Harris, D. A. Cellular biology of prion disease. *Clin.Microbiol. Rev.* 12 (1999): 429.
Horwich, A. L. y J. S.Weissman. Deadly conformations: Protein misfolding in prion disease. *Cell* 89 (1997): 499.
Prusiner, S. B. The prion diseases. *Sci. Amer.* 272 (January 1995): 48.
Prusiner, S. B. Prions. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 95 (1998): 1363.
Prusiner, S. B. y M. R. Scott. Genetics of prions.*Annu. Rev. Genet.* 31 (1997): 139.
•Reisner, D. y H. H. Gross.Viroids. *Annu. Rev. Biochem.* 54 (1985): 531.
Uptain, S. M. y S. Lindquist. Prions as protein-based genetic elements. *Annu. Rev. Microbiol.* 56 (2002): 703.



5

Bionergética: el flujo de energía en la célula

En términos generales, las células tienen cuatro necesidades esenciales: *piezas de construcción moleculares, catalizadores químicos* denominados enzimas, *información* que guíe todas sus actividades, y *energía* para impulsar las diferentes reacciones y procesos esenciales para la función biológica y para la vida. En el Capítulo 3, consideramos las distintas moléculas que necesitan las células, incluyendo aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos. A éstos añadiremos otras moléculas esenciales e iones, tales como el agua, sales inorgánicas, iones metálicos, oxígeno y dióxido de carbono. Algunos de estos materiales los producen las células; otros se obtienen del entorno.

En ausencia de catalizadores, la mayoría de las reacciones químicas que tienen lugar en las células y que son necesarias para mantener la vida, se producirían de una forma mucho más lenta. De ahí que se requiera la presencia de *enzimas* que aceleren la velocidad de las reacciones en varios órdenes de magnitud. Consideraremos las enzimas y las reacciones catalizadas por ellas en el Capítulo 6.

El tercer requerimiento general de las células es la información para guiar y dirigir sus actividades. Como sabemos desde el Capítulo 3, la información está codificada en los nucleótidos de las secuencias de DNA y de RNA y se expresa en la síntesis de proteínas específicas. La información genética que se almacena, transmite y expresa como DNA, RNA y proteínas determina qué clase de reacciones químicas puede llevar a cabo una célula, qué clase de estructuras es capaz de formar y qué clase de funciones puede realizar. Trataremos el flujo y la expresión de la información genética en los Capítulos 18-22.

Además de moléculas, enzimas e información, todas las células requieren *energía*. La energía es necesaria para impulsar las reacciones químicas implicadas en la formación de componentes moleculares y para propulsar las numerosas actividades que realizan estos componentes. La capacidad para obtener, almacenar y usar la energía es, de hecho, una de las características más evidentes de los seres vivos (Figura 5.1). Como el flujo de información, el flujo de energía es un tema muy importante en este texto. El flujo de energía se introduce en este capítulo y se considerará en detalle en los Capítulos 9-11.



Figura 5.1 Energía y vida. La capacidad para gastar energía es una de las características más obvias de la vida en los dos niveles, el celular y el del organismo.

La importancia de la energía

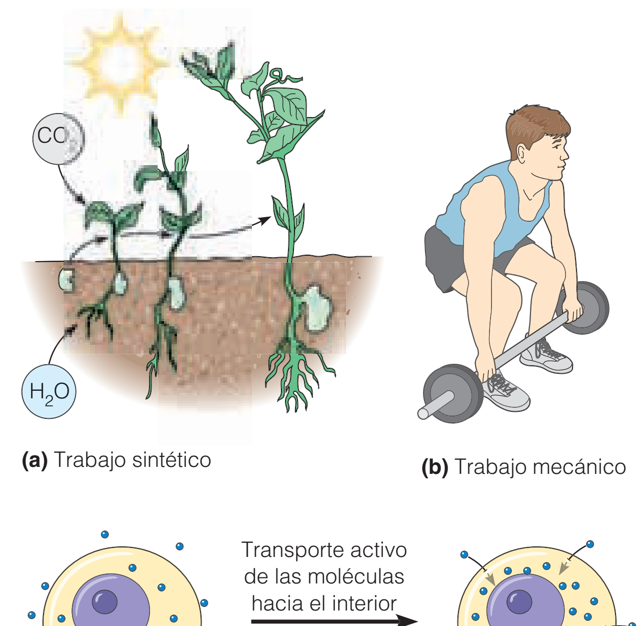
Todos los sistemas vivos requieren un aporte continuo de energía. De manera habitual, la energía se define como la capacidad de realizar un trabajo. Pero esta definición se vuelve en cierta medida circular ya que el trabajo se define con frecuencia en términos de variaciones de energía. Una definición más útil es que la energía es la capacidad de causar cambios específicos. Puesto que la vida se caracteriza en primer lugar y sobre todo por el cambio, esta definición subraya que cualquier forma de vida depende totalmente de la continua disponibilidad de energía.

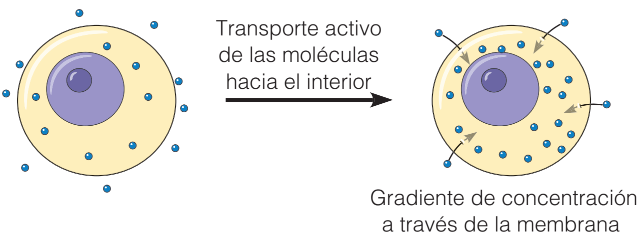
Las células necesitan energía para impulsar seis tipos de cambios diferentes

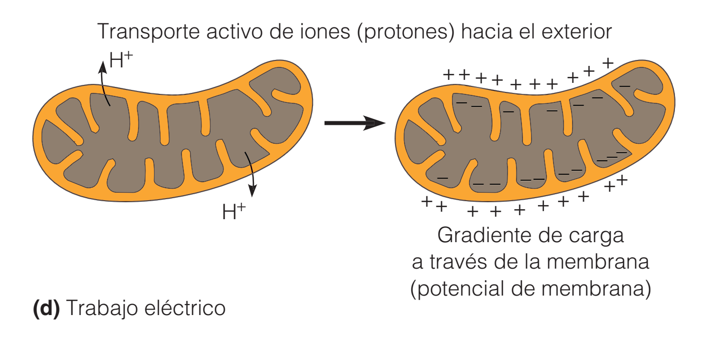
Ahora que hemos definido la energía de esta manera, nos damos cuenta de que preguntarse acerca de las necesidades energéticas de las células supone indagar en los tipos de cambios que las células tienen que efectuar —es decir, indagar en las actividades celulares que dan lugar al cambio—. Se nos ocurren seis categorías de cambios, que definen seis clases de trabajo: trabajo de síntesis, trabajo mecánico, trabajo para concentrar moléculas y trabajo eléctrico, así como el trabajo necesario para generar luz y calor (Figura 5.2).

Trabajo de síntesis: cambios en los enlaces químicos. La biosíntesis es una actividad importante que realizan prácticamente todas las células durante todo el tiempo, que tiene como resultado la formación de nuevos enlaces y la generación de nuevas moléculas. Esta actividad es especialmente evidente en las poblaciones celulares en crecimiento, donde se observa que se sintetizan moléculas nuevas si las células aumentan en número, en tamaño o en ambas cosas. Además, el trabajo de síntesis es necesario para mantener las estructuras, de la misma forma que fue necesario para originarlas. La mayoría de los componentes estructurales existentes en la célula se encuentran en un estado de renovación constante. Las moléculas que determinan la estructura son degradadas y sustituidas de forma continua.

En términos de la jerarquía de la estructura celular que se muestra en la Figura 2.14, casi toda la energía que la célula requiere para el trabajo de biosíntesis se destina a con-







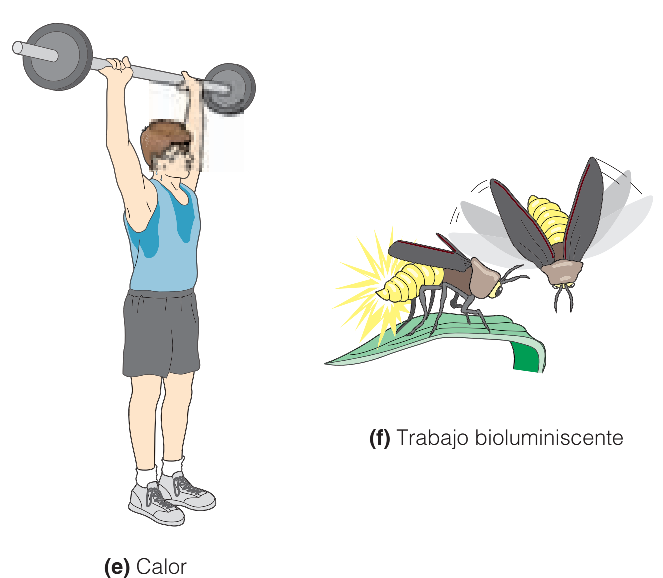


Figura 5.2 Clases de trabajo biológico. Aquí se muestran las seis categorías más importantes de trabajo biológico. (**a**) Trabajo sintético ilustrado por el proceso de la fotosíntesis, (**b**) Trabajo mecánico, por la contracción de los músculos de un levantador de pesas, y (**c**) Trabajo de concentración, por la captación de moléculas en una célula contra de un gradiente de concentración. (**d**) El trabajo eléctrico se representa por el potencial de membrana de una mitocondria (mostrado como generado por un transporte activo de protones), (**e**) Producción de calor, ilustrado por el sudor del levantador de pesas y (**f**) bioluminiscencia, representado por el cortejo de las luciérnagas.

seguir moléculas orgánicas ricas en energía a partir de materiales iniciales más simples, y para activar estas moléculas orgánicas para que se incorporen a las macromoléculas. Como sabemos desde los Capítulos 2 y 3, los niveles de complejidad estructural más elevada se producen por auto-ensamblaje espontáneo, sin mayor aporte energético.

Trabajo mecánico: cambios en la localización y orientación de una célula o de su estructura subcelular. El **trabajo mecánico** implica un cambio físico en la posición u orientación de la célula o de parte de ella. Un ejemplo especialmente bueno es el movimiento de una célula con respecto a su entorno. Este movimiento requiere la presencia en la célula de algún tipo de apéndice móvil como un cilio o un flagelo. Muchas células procariotas se autopropulsan a través del entorno, como la bacteria flagelada de la Figura 5.3. A veces, sin embargo, es el medio el que se mueve sobre la célula, como cuando las células ciliadas que tapizan la tráquea barren las partículas inhaladas hacia la boca o la nariz, protegiendo de esta forma a los pulmones. La contracción muscular es otro buen ejemplo de trabajo mecánico que no implica a una única célula sino a un gran número de células musculares (Figura 5.4). Otros ejemplos de trabajo mecánico que se producen en la célula incluyen el movimiento de los cromosomas a lo largo de las fibras del huso durante la mitosis, las corrientes de citoplasma y el movimiento del ribosoma a lo largo de la hebra de RNA mensajero.

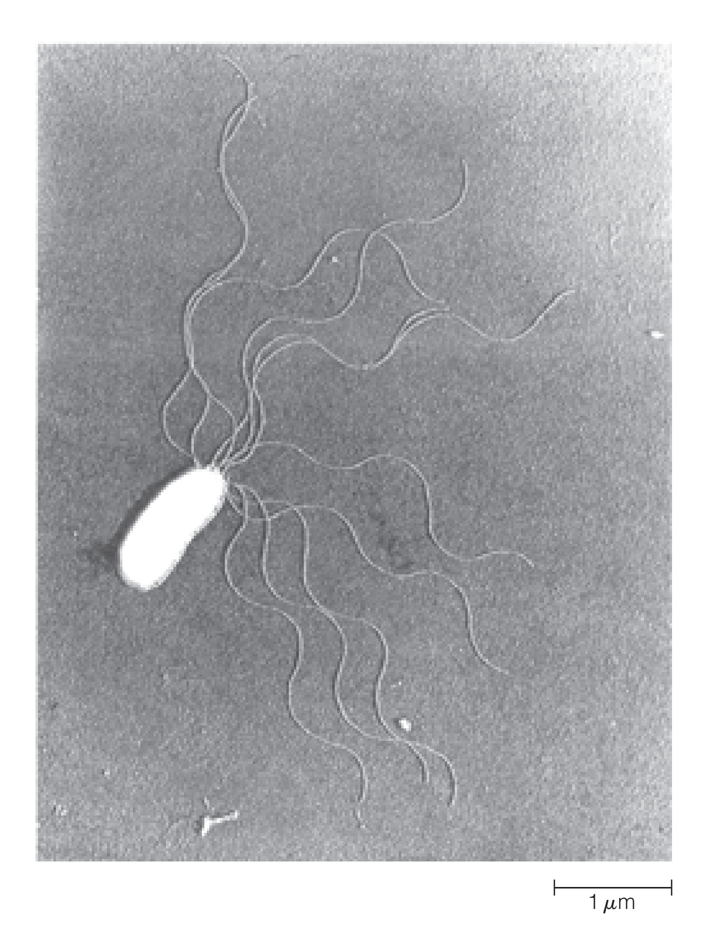


Figura 5.3 Una bacteria flagelada. El movimiento de batido de un flagelo bacteriano es un ejemplo de trabajo mecánico, le proporciona movilidad a algunas especies bacterianas (TEM).

Trabajo de concentración: movimiento de moléculas a través de una membrana en contra de un gradiente de concentración. El trabajo de mover moléculas en contra de un gradiente de

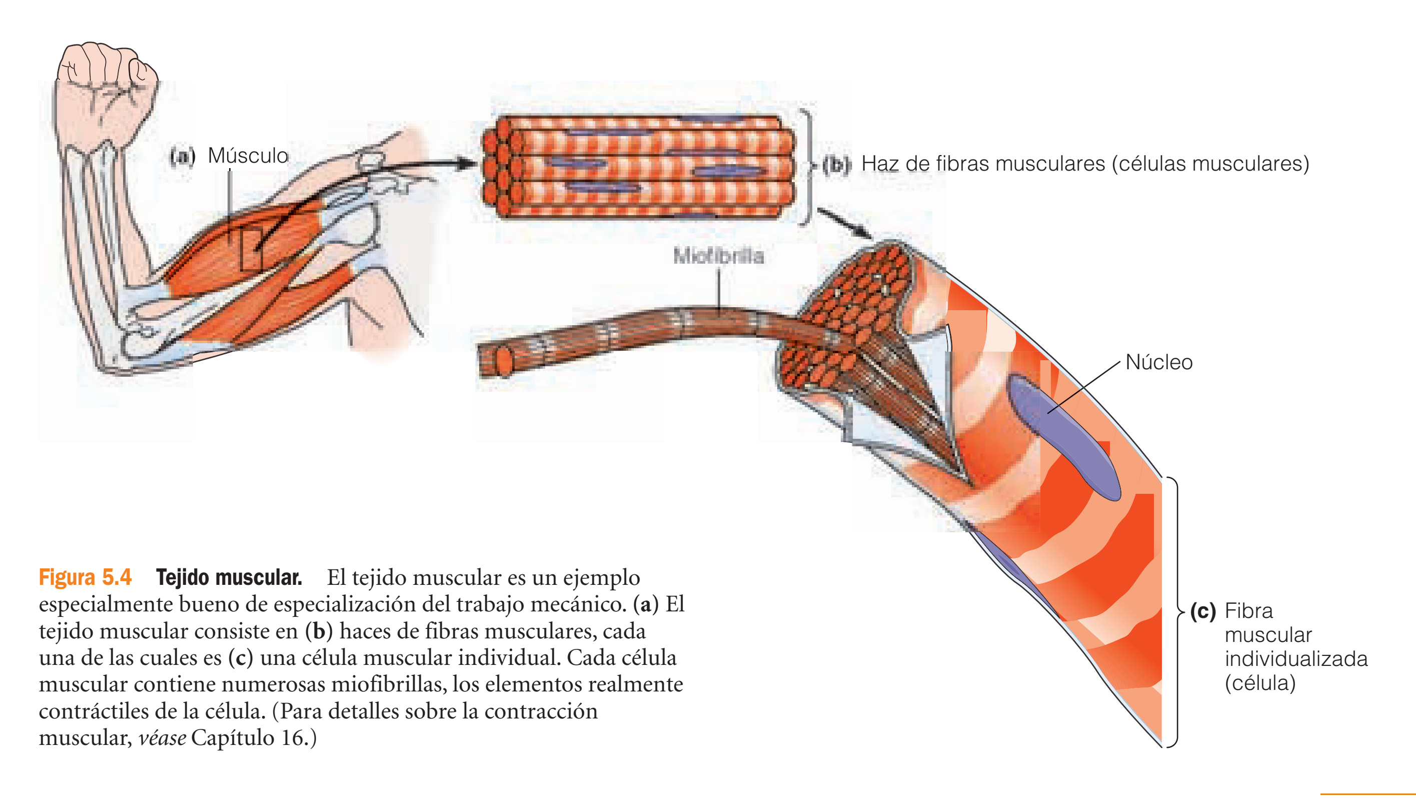


Figura 5.4 Tejido muscular. El tejido muscular es un ejemplo especialmente bueno de especialización del trabajo mecánico. (**a**) El tejido muscular consiste en (**b**) haces de fibras musculares, cada una de las cuales es (**c**) una célula muscular individual. Cada célula muscular contiene numerosas miofibrillas, los elementos realmente contráctiles de la célula. (Para detalles sobre la contracción muscular, *véase* Capítulo 16.)

concentración es menos evidente que cualquiera de las dos categorías anteriores, pero es igual de importante para la célula. El propósito del **trabajo de concentración** es acumular sustancias dentro de la célula o de algún compartimento subcelular, o bien retirar subproductos de la actividad celular que no pueden seguir siendo utilizados por la célula y que podrían ser incluso tóxicos si se les permitiera acumularse en el interior celular. Algunos ejemplos del trabajo de concentración incluyen el transporte activo de moléculas de azúcares o de aminoácidos a través de la membrana plasmática y la concentración de moléculas específicas dentro de los orgánulos.

Trabajo eléctrico: movimiento de iones a través de la membrana en contra de un gradiente electroquímico. El **trabajo eléctrico** se considera con frecuencia un caso especial de trabajo de concentración debido a que también implica movimientos a través de membranas. En este caso, sin embargo, los iones se transportan y el resultado no es sólo un cambio en la concentración de iones sino también el establecimiento de un potencial eléctrico a través de la membrana. Cada membrana tiene un potencial característico que se genera de esta forma. Es esencial que exista un gradiente electroquímico de protones, a través de la membrana de la mitocondria o del cloroplasto, para la producción de ATP tanto en la respiración (Capítulo 10) como en la fotosíntesis (Capítulo 11). El trabajo eléctrico es también importante en el mecanismo por el cual los impulsos se conducen en las células nerviosas y musculares (Capítulo 13). Un ejemplo de trabajo eléctrico especialmente significativo es el que se encuentra en *Electrophorus electricus*, la anguila eléctrica. El órgano eléctrico de *Electrophorus* consiste en capas de células denominadas *electroplacas*, cada una de las cuales puede generar un potencial de membrana de alrededor de 150 milivoltios (mV). Debido a que el órgano eléctrico contiene miles de células de ese tipo dispuestas en serie, la anguila puede desarrollar potenciales eléctricos de varios cientos de voltios.

Calor: un aumento de temperatura que puede ser útil para los animales de sangre caliente. Es fácil olvidarse del calor, ya que los organismos vivos no utilizan el calor como fuente de energía en la misma medida en que lo hace una máquina de vapor. Pero el calor es, de hecho, una fuente de energía principal en los *homeotermos* (animales que regulan su temperatura corporal independientemente del entorno). De hecho, al mismo tiempo que está leyendo estas líneas, alrededor de dos tercios de su energía metabólica se está utilizando sólo para mantenerle caliente —es decir, para mantener su cuerpo a 37 °C, temperatura a la cual funciona de manera más eficaz—. La relación entre el trabajo y la producción de energía en forma de calor se manifiesta cuando suda mientras hace ejercicio o tirita cuando tiene frío.

Bioluminiscencia: la producción de luz. Para terminar, debemos incluir la producción de luz, o **bioluminiscencia**, como otra forma en la que las células utilizan la energía. La luz producida por los organismos bioluminiscentes se genera por la reacción del ATP con compuestos luminiscentes específicos y usualmente es de color azul pálido. El uso de esta clase de energía es mucho más especializado que las otras cinco categorías, y de cara a nuestro propósito actual, vamos a dejarlo para las luciérnagas, setas venenosas luminosas, dinoflagelados, peces de las profundidades marinas, y otras criaturas que viven en su extraña luz fría.

La mayoría de los organismos obtienen la energía de la luz del sol o de las moléculas orgánicas de los alimentos

Casi toda la vida en la Tierra se basa, directa o indirectamente, en la luz del sol que continuamente inunda nuestro planeta de energía. Estas *radiaciones solares* son fácilmente cuantificables: la energía solar llega a la parte superior de la atmósfera de la Tierra a una tasa de 1,94 cal/min por centímetro cuadrado de superficie transversal, un valor que se conoce como *constante solar*. Por supuesto, no todos los organismos pueden obtener energía directamente a partir de la luz del sol. De hecho, los organismos (y por extensión las células) pueden ser clasificados en dos grupos basándose en sus fuentes de energía.

El primer grupo consiste en organismos capaces de captar la energía luminosa por medio de sistemas de pigmentos fotosintéticos, que almacenan la energía en forma de moléculas orgánicas como la glucosa. Tales organismos se denominan **fotótrofos** (literalmente comedores de luz) e incluyen plantas, algas, cianobacterias y ciertos grupos de bacterias capaces de realizar la fotosíntesis. Los enlaces químicos de las moléculas orgánicas proporcionan una fuente de energía que puede ser utilizada por un segundo tipo de organismos denominados **quimiótrofos** (literalmente comedores de química), debido a que requieren la ingesta de compuestos químicos tales como carbohidratos, grasas y proteínas. Todos los animales, protistas, hongos y la mayoría de las bacterias son quimiótrofos.

Un punto que a menudo no se aprecia con respecto a los fotótrofos, es que, aunque pueden utilizar la energía solar cuando está disponible, son también capaces de funcionar como quimiótrofos y, de hecho, lo hacen cuando no están iluminados. La mayoría de las plantas superiores son en realidad una mezcla de células fotótrofas y quimiótrofas. Una célula de la raíz de una planta, aunque parte de un organismo obviamente fotótrofo, es en la mayoría de los casos incapaz de realizar la fotosíntesis y es tan quimiótrofa como una célula animal.

La energía fluye continuamente a través de la biosfera

Hasta el momento hemos visto que tanto quimiótrofos como fotótrofos dependen de su entorno para obtener la energía que necesitan, pero difieren en la forma de energía

que pueden utilizar. Los quimiótrofos requieren moléculas orgánicas, mientras que los fotótrofos captan las radiaciones solares y las convierten en la energía de los enlaces químicos.

El flujo de energía a través de la biosfera está representado en la Figura 5.5. La energía solar es captada por los fotótrofos y utilizada para convertir dióxido de carbono y agua en materiales celulares más complejos (y más reducidos) durante el proceso de la fotosíntesis. Como se verá en el Capítulo 11, los productos inmediatos de la fijación de carbono en la fotosíntesis son azúcares, pero en cierto modo se puede considerar al organismo fotótrofo en sí mismo como el «producto» de la fotosíntesis, ya que cada átomo de carbono de cada molécula de ese organismo deriva del dióxido de carbono que se fija en forma orgánica por el proceso fotosintético.

Por otro lado, los quimiótrofos son incapaces de utilizar la energía solar directamente y dependen de la energía química de las moléculas oxidables. Las necesidades de energía de los quimiótrofos se pueden satisfacer *anaeróbicamente* (en ausencia de oxígeno) por *fermentación*, o *aeróbicamente* (en presencia de oxígeno) por la oxidación completa de compuestos químicos en el proceso de la *respiración aerobia*. Por eso, los quimiótrofos dependen completamente de la energía que los fotótrofos empaquetan en las moléculas fermentables u oxidables de los alimentos.

Tanto los fotótrofos como los quimiótrofos utilizan energía para realizar trabajo —esto es, el efecto de los distintos tipos de cambios que ya hemos catalogado—. En el proceso se producen dos tipos de pérdidas. Uno de los principios de la conversión de energía es que ningún proceso químico o físico sucede con un rendimiento del 100%; algo de energía se pierde en forma de calor. De hecho, la mayoría de los procesos que implican la conversión de una forma de energía a otra, en realidad disipan más energía en forma de calor de lo que logran convertir en la forma de energía deseada.

Los procesos biológicos son extraordinariamente eficaces en convertir energía. Las *pérdidas de calor* son, no obstante, inevitables en las transacciones biológicas de energía. A veces, al calor liberado durante los procesos celulares se le da un buen uso. Como se trató anteriormente, los animales de sangre caliente usan el calor para mantener la temperatura corporal a un nivel constante, normalmen-

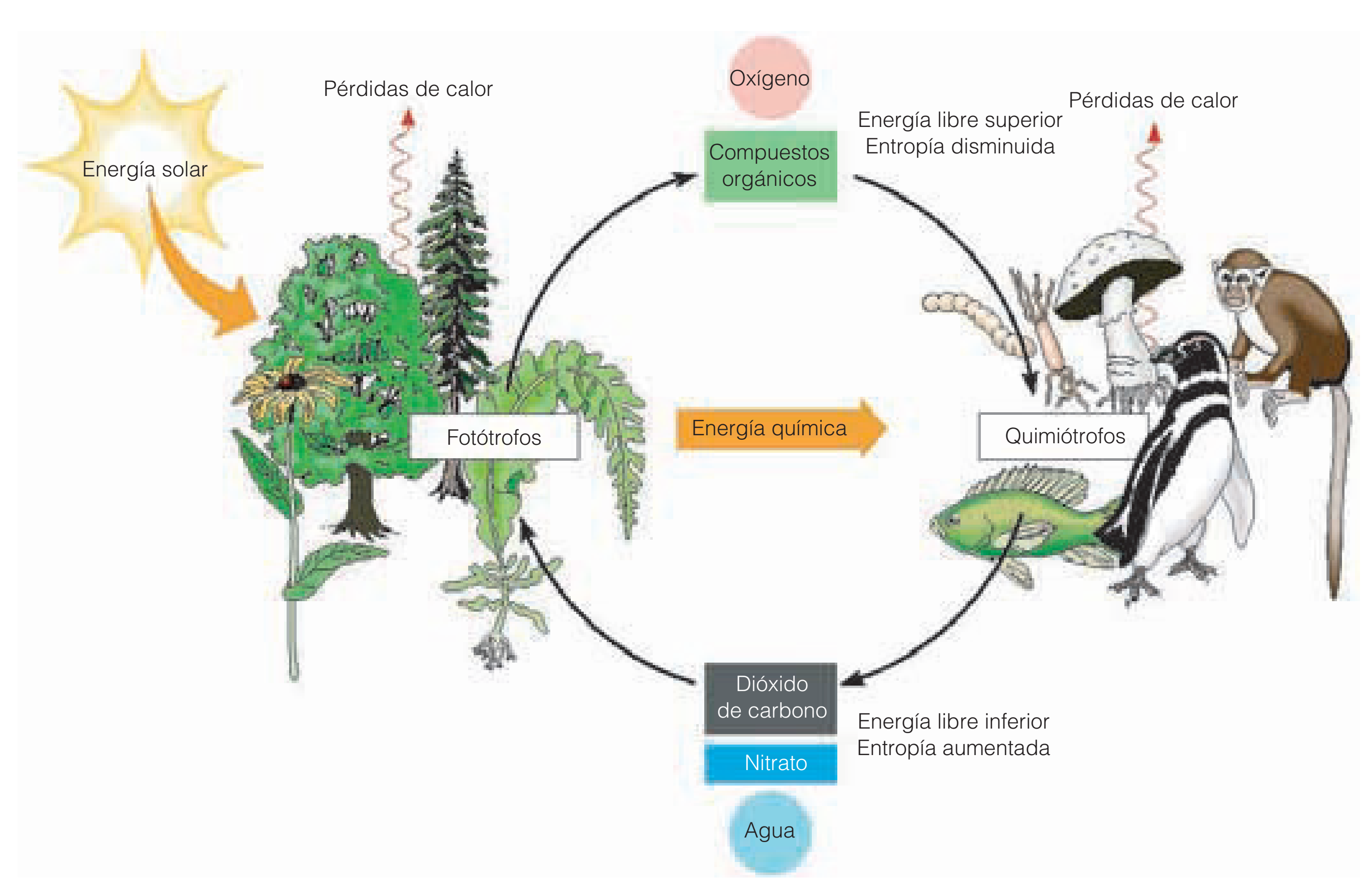


Figura 5.5 El flujo de energía a través de la biosfera. La mayoría de la energía de la biosfera se origina en el sol y finalmente contribuye al aumento permanente de la entropía del universo. El flujo unidireccional de energía desde los fotótrofos hasta los quimiótrofos va acompañado de un flujo cíclico de materia entre los dos grupos de organismos. (Como aprenderemos en el Capítulo 11, los fotótrofos se pueden dividir a su vez en dos grupos, dependiendo de su fuente de carbono. Los *fotoautótrofos*, que obtienen su carbono a partir del CO_2, y los *fotoheterótrofos* que dependen de fuentes orgánicas de carbono reducido. Todos los fotótrofos mostrados en este diagrama son fotoautótrofos; la mayoría de los fotoheterótrofos son bacterias.)

te por encima de la temperatura ambiente. Algunas plantas utilizan el calor generado metabólicamente para fundir la nieve que la cubre o para atraer a los polinizadores (Figura 5.6). Sin embargo, de manera general, el calor simplemente se disipa en el entorno y se pierde.

Mucho más importante es el aumento de entropía que acompaña a las actividades celulares. Hablaremos de ello con más detalle en breve; aquí simplemente apuntaremos que cada reacción o proceso que sucede en cualquier parte del universo siempre lo hace de tal manera que la entropía total, o desorden, aumenta en el universo. Este cambio en la entropía sucede a expensas de la energía que de otra forma habría estado disponible para hacer trabajo útil, y es por tanto un «sumidero» inevitable por el que se pierde energía. Precisamente como la fuente inicial de energía de casi toda la biosfera es el sol, el destino final de toda la energía de la biosfera es volver aleatoriamente al universo como aumento de entropía.

Visto desde una escala cósmica, hay un flujo de energía continuo, masivo y unidireccional desde su fuente en las reacciones solares de fusión nuclear hasta su sumidero final, la entropía del universo. Nosotros, aquí en la biosfera, somos los custodios transitorios de una pequeña porción casi infinitesimal de esa energía, pero es precisamente esa pequeña, pero crítica, fracción de energía y su flujo a través de los sistemas vivos la que nos concierne. El flujo comienza en las plantas verdes, que utilizan la energía de la luz para impulsar a los electrones para que formen nuevos enlaces químicos «con coste (esfuerzo) energético». Esta energía es entonces liberada tanto por plantas como por animales «sin esfuerzo» o «sin coste» en reacciones de fermentación u oxidación. Este flujo de energía a través de la materia viva —desde el sol, a los fotótrofos, a los quimiótrofos, a calor— impulsa la maquinaria molecular de todos los procesos de la vida.



Figura 5.6 Voodoo Lily, una planta que depende del calor generado metabólicamente para atraer a los polinizadores. El *Sauromatum guttatum* calienta ciertas partes de sus flores. La planta es polinizada por moscas, que aparentemente confunden las flores con carne muerta. La flor emite olores que ayudan a atraer a las moscas, y el calentamiento ayuda a dispersar los gases odoríferos.

El flujo de energía a través de la biosfera va acompañado de un flujo de materia

La energía entra en la biosfera desprovista de materia (como fotones de luz) y abandona la biosfera de manera similar (como pérdida de calor y aumento de entropía). Sin embargo, cuando la energía atraviesa la biosfera, existe fundamentalmente en forma de energía asociada a los enlaces químicos de las moléculas orgánicas oxidables de las células y organismos. Como resultado, el flujo de energía en la biosfera está acoplado al inmenso flujo de materia correspondiente.

Mientras que la energía fluye unidireccionalmente desde el sol y atravesando a los fotótrofos llega a los quimiótrofos, la materia fluye de forma cíclica entre los dos grupos de organismos (*véase* Figura 5.5). Durante la respiración, los quimiótrofos aerobios toman nutrientes orgánicos del medio circundante, normalmente ingiriendo fotótrofos u otros quimiótrofos que a su vez habían comido fotótrofos. Estos nutrientes se oxidan hasta dióxido de carbono y agua, moléculas de baja energía que son devueltas al ambiente. Estas moléculas se convierten entonces en la materia prima que los organismos fotótrofos utilizan para fabricar nuevas moléculas orgánicas mediante la fotosíntesis, devolviendo oxígeno al entorno en el proceso.

Además, hay un ciclo de nitrógeno concomitante. Los fotótrofos obtienen nitrógeno del entorno en forma inorgánica (a menudo como nitrato procedente del suelo, en algunos casos como N_2 de la atmósfera), convirtiéndolo en amoníaco, y utilizándolo en la síntesis de aminoácidos, proteínas, nucleótidos y ácidos nucleicos. Finalmente, estas moléculas, como otros componentes de las células fotótrofas, son consumidas por los quimiótrofos. El nitrógeno es convertido de nuevo en amoníaco y eventualmente en nitrato —por microorganismos del suelo en el último caso—.

El dióxido de carbono, el oxígeno, el nitrógeno y el agua circulan de esta forma continuamente entre el mundo de los fotótrofos y el de los quimiótrofos, siempre entrando en la esfera de los quimiótrofos como compuestos ricos en energía y dejándola otra vez en una forma pobre en energía. Los dos grandes grupos de organismos se pueden imaginar como si cada uno viviera una relación simbiótica con el otro, con un flujo cíclico de materia y un flu-

jo unidireccional de energía como componentes de esa simbiosis.

Cuando tratamos el flujo macroscópico global de materia y energía en los organismos vivos, nos encontramos a la biología celular interactuando con la ecología. Los ecologistas están muy preocupados por los ciclos de energía y de nutrientes, el papel de diversas especies en estos ciclos y los factores medioambientales que afectan al flujo. A nivel celular, nuestra principal preocupación es cómo el flujo de energía y materia que hemos considerado a escala macroscópica se puede expresar y explicar a escala molecular, en términos de transacciones de energía y de procesos químicos dentro de las células. Por tanto, para dar cuenta de estos ciclos, dejamos los ciclos macroscópicos para los ecologistas y dirigimos nuestra atención a las reacciones que suceden dentro de las células individuales de las bacterias, plantas y animales. Primero, sin embargo, debemos familiarizarnos con los principios físicos subyacentes a las transacciones de energía y para ello nos dirigimos al tema de la Bioenergética.

Bioenergética

Los principios que gobiernan el flujo de energía se incluyen en un área de la ciencia que el químico físico denomina **termodinámica**. Aunque el prefijo *termo*-sugiere que el término se limita a calor (y éste es de hecho su origen histórico), la termodinámica también tiene en cuenta otras formas de energía y procesos que convierten la energía de una forma a otra. En concreto, la termodinámica se ocupa de las leyes que gobiernan las transacciones de energía que inevitablemente acompañan a la mayoría de los procesos físicos y a todas las reacciones químicas. La **Bioenergética**, en cambio, se puede considerar como una *termodinámica aplicada,* esto es, se ocupa de la aplicación de los principios de la termodinámica a las reacciones y procesos del mundo biológico.

Para entender el flujo de energía, necesitamos comprender los sistemas, el calor y el trabajo

Como ya hemos visto, es útil definir la energía no simplemente como la capacidad de hacer un trabajo sino específicamente como la capacidad de causar cambios. Sin energía, todos los procesos se colapsarían, incluyendo aquellos asociados con las células vivas.

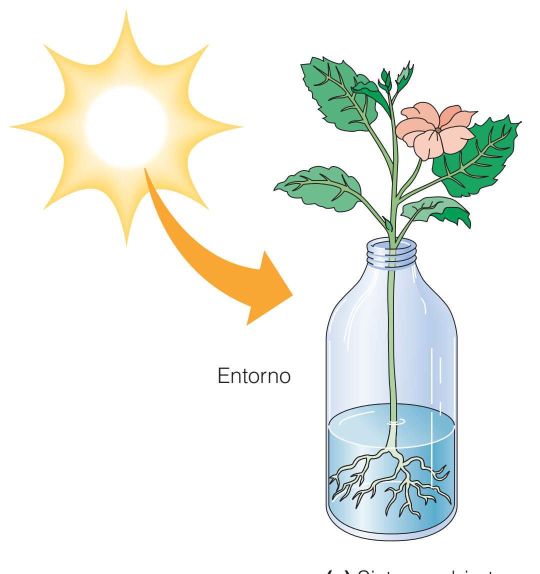
La energía existe en diversas formas, muchas de ellas de interés para los biólogos. Piense, por ejemplo, en la energía que representa un rayo de sol, una cucharada de azúcar, un flagelo en movimiento, un electrón excitado, o la concentración de iones o moléculas pequeñas dentro de una célula o en un orgánulo. Estos fenómenos son diversos, pero todos ellos están gobernados por ciertos principios básicos de energética.

La energía se distribuye por todo el universo y es necesario considerar la energía total del universo para algunos propósitos, por lo menos de manera teórica. Normalmente, sin embargo, estamos interesados no en el universo en su conjunto sino en una pequeña porción de él. Podríamos, por ejemplo, ocuparnos de una reacción o proceso que ocurriera en un vaso de precipitados con productos químicos, en una célula o en un bloque de metal. Por convención, la porción limitada de universo que uno desea considerar en el momento se denomina **sistema** y al resto del universo le denominamos **entorno**. A veces, el sistema tiene una frontera natural, como un vaso de precipitados de vidrio o la membrana de una célula. En otros casos, la frontera entre el sistema y su entorno es una hipótesis que uno sólo utiliza por comodidad en la discusión, como es la frontera imaginaria alrededor de un mol de moléculas de glucosa en una solución.

Los sistemas pueden ser abiertos o cerrados, dependiendo de si pueden o no intercambiar energía con su entorno (Figura 5.7). Un *sistema cerrado* está aislado de su entorno y no puede recibir ni liberar energía en ninguna forma. Un *sistema abierto*, por otro lado, puede recibir o perder energía. Como veremos más tarde, los niveles de organización que muestran ordinariamente los sistemas biológicos son sólo posibles debido a que las células y organismos son sistemas abiertos, capaces tanto de la captación como de la liberación de energía. Concretamente, los sistemas biológicos requieren un influjo constante de energía y a gran escala desde su entorno, tanto para alcanzar como para mantener los niveles de complejidad que les son propios. Es por eso por lo que las plantas necesitan luz solar y usted necesita alimentos.

Cuando hablamos acerca de un sistema, tenemos que ser cuidadosos para especificar el estado del sistema. Se dice que un sistema está en un estado específico si cada una de sus propiedades variables (tales como temperatura, presión y volumen) se mantienen constantes con un valor específico. En tal situación, el contenido de energía total del sistema, aunque no es directamente medible, tiene un valor único. Si entonces el sistema cambia de un estado a otro como resultado de las interacciones entre el sistema y su entorno, el cambio en su energía total se determinará únicamente por los estados inicial y final del sistema y no se verá afectado en absoluto por el mecanismo que ha generado el cambio ni por los estados intermedios a través de los cuales puede pasar el sistema. Ésta es una propiedad muy útil debido a que permite calcular las variaciones de energía partiendo solamente del conocimiento de los estados inicial y final.

El problema de hacer el seguimiento de las variables del sistema y su efecto sobre los cambios de energía se puede simplificar si una o más de las variables se mantienen constantes. Afortunadamente, éste es el caso de muchas de las reacciones biológicas, debido a que normalmente suceden en soluciones diluidas dentro de células que se en-



(a) Sistema abierto



(b) Sistema cerrado

Figura 5.7 Sistemas abierto y cerrado. Un sistema es esa porción del universo en consideración. El resto del universo se denomina el entorno del sistema. (**a**) Un sistema abierto puede intercambiar energía con su entorno, mientras que (**b**) un sistema cerrado no puede. El sistema abierto puede usar la energía recibida para aumentar su orden, disminuyendo de ese modo su entropía. El sistema cerrado tiende hacia el equilibrio y aumenta su entropía. Todos los organismos vivos son sistemas abiertos, que intercambian energía libremente con su entorno.

cuentran aproximadamente a la misma presión y temperatura a lo largo del curso de la reacción. Estas condiciones ambientales, así como el volumen celular, tardan en cambiar en comparacióncon la velocidad de las reacciones biológicas. Esto quiere decir que tres de las variables más importantes del sistema de las que se ocupan los físico-químicos —temperatura, presión y volumen— se mantienen esencialmente constantes en la mayoría de las reacciones biológicas.

El intercambio de energía entre un sistema y su entorno se produce de dos formas: como calor y como trabajo. El calor es la transferencia de energía de un lugar a otro como resultado de una diferencia de temperatura entre los dos sitios. La transferencia es siempre espontánea desde el lugar más caliente al más frío. El calor es una forma de energía extremadamente útil para muchas máquinas y otros aparatos diseñados para llevar a cabo trabajos mecánicos. Sin embargo, su utilidad biológica es limitada ya que la mayoría de los sistemas biológicos operan bajo condiciones en las que la temperatura se mantiene fija o varía mínimamente. Estos sistemas *isotérmicos* carecen de los gradientes de temperatura necesarios para convertir el calor en otras fuentes de energía. Como resultado, el calor no es una fuente de energía útil para las células, aunque se puede utilizar para propósitos tales como el mantenimiento de la temperatura corporal o atraer a polinizadores como hemos apuntado previamente.

En los sistemas biológicos, el **trabajo** es el uso de la energía para realizar cualquier proceso distinto del flujo de calor. Por ejemplo, se realiza un trabajo cuando los músculos de tu brazo gastan energía química para levantar este libro. Cuando una hoja de maíz usa la energía de la luz para sintetizar azúcar o cuando una anguila eléctrica utiliza los gradientes de concentración iónicos del tejido de su electroplaca para provocar un choque eléctrico. Nos interesaremos principalmente en la cantidad disponible de energía útil para realizar trabajo celular cuando empecemos a calcular las variaciones de energía asociados con las reacciones específicas que las células llevan a cabo.

Para cuantificar las variaciones de energía durante las reacciones químicas o los procesos físicos necesitamos unidades en las que se pueda expresar la energía. En química biológica las variaciones de energía se expresan usualmente en términos de **caloría (cal)** que se define como la cantidad de energía necesaria para calentar un gramo de agua un grado centígrado (concretamente desde 14,5 °C hasta 15,5 °C) a 1 atmósfera de presión. (De nuevo fíjese en que la unidad de medida de energía, como el mismo término *termodinámica*, se basa en el calor, pero se aplica normalmente a todas las formas de energía.) Una unidad alternativa de energía, el **julio (J)**, es la preferida por los físicos y se usa en algunos textos de bioquímica. La conversión es sencilla: 1 cal = 4,184 J, ó 1 J = 0,239 cal.

Las variaciones de energía se miden frecuentemente por mol, y la forma más común en que encontraremos las unidades de energía en química biológica será como calorías (o a veces kilocalorías) por mol (cal/mol o kcal/mol). (Sea cuidadoso para diferenciar entre la caloría tal como se define aquí y la *Caloría nutricional*, que se usa frecuentemente para expresar el contenido energético de los alimentos. La caloría nutricional se representa con una C y es en realidad una *kilocaloría* como se define aquí.)

La primera ley de la termodinámica nos dice que la energía se conserva

Mucho de lo que entendemos de los principios que gobiernan el flujo de energía puede resumirse por las tres leyes de la termodinámica. De ellas sólo la primera y la segunda son de especial relevancia para el biólogo celular. La **primera**

ley de la termodinámica es llamada *ley de conservación de la energía*. Dicho simplemente, la primera ley establece que *en todo cambio químico o físico la cantidad total de energía en el universo permanece constante, aunque la forma de la energía puede cambiar*. O, en otras palabras, *la energía puede convertirse de una forma en otra pero nunca puede crearse o destruirse*. (Si está familiarizado con la conversión de masa en energía que ocurre en las reacciones nucleares, reconocerá que una definición más exacta tendría en cuenta tanto la masa como la energía. Sin embargo, para los propósitos de la química biológica la ley es adecuada tal como se ha expresado.) Aplicada al universo en conjunto o a un sistema cerrado, la primera ley significa que la cantidad total de energía presente en todas sus formas debe ser la misma antes y después de que ocurra cualquier proceso o reacción. Aplicada a un sistema abierto tal como una célula, la primera ley dice que durante el curso de cualquier reacción o proceso, la cantidad total de energía que sale del sistema debe ser exactamente igual a la energía que entra en el sistema menos cualquier energía que quede atrás y que por tanto se almacenará en el sistema.

La energía total almacenada dentro de un sistema se denomina **energía interna** del sistema, representada por el símbolo ***E***. Normalmente no nos preocupamos por el valor concreto de E para un sistema porque ese valor no puede medirse directamente. Sin embargo, es posible medir *el incremento de la energía interna*, ΔE, que ocurre durante un proceso dado. ΔE es la diferencia entre la energía interna del sistema antes del proceso (E_1) y después del proceso (E_2):

$$\Delta E = E_2 - E_1 \quad \textbf{(5.1)}$$

La Ecuación 5.1 es válida para todos los procesos físicos y químicos bajo cualquier condición. Para una reacción química podemos escribir

$$\Delta E = E_{\text{productos}} - E_{\text{reactivos}} \quad \textbf{(5.2)}$$

En el caso de reacciones y procesos biológicos estamos usualmente más interesados en la variación de la **entalpía**, o *cantidad de calor*. La entalpía se representa por el símbolo ***H*** (de *heat*, calor) y se relaciona con la energía interna E por un término que combina tanto la presión (P) como el volumen (V):

$$H = E + PV \quad \textbf{(5.3)}$$

A diferencia de muchas reacciones químicas, las reacciones biológicas ocurren generalmente con cambios pequeños o nulos tanto de la presión (normalmente 1 atmósfera) como del volumen. De manera que, para las reacciones biológicas, tanto ΔP como ΔV son normalmente 0 (o al menos despreciables), y podemos escribir

$$\Delta H = \Delta E + \Delta(PV) \cong \Delta E \quad \textbf{(5.4)}$$

Por tanto, los biólogos determinan rutinariamente las variaciones de la cantidad de calor para las reacciones de interés con la confianza de que los valores son estimaciones válidas de ΔE.

La variación de la entalpía que acompaña a una reacción específica es simplemente la diferencia entre la cantidad de calor entre los reactivos y los productos de la reacción:

$$\Delta H = H_{\text{productos}} - H_{\text{reactivos}} \quad \textbf{(5.5)}$$

El valor de ΔH para un proceso o reacción específica será positivo o negativo. Si la cantidad de calor de los productos es menor que la de los reactivos, ΔH será negativo y se dice que la reacción es *exotérmica*. Si la cantidad de calor de los productos es mayor que la de los reactivos ΔH será positiva y la reacción es *endotérmica*. Por tanto, el valor ΔH para una reacción es simplemente una medida del calor que es liberado o absorbido por esa reacción (para valores de ΔH negativos y positivos, respectivamente) tal como ocurre bajo condiciones de temperatura y presión constantes.

La segunda ley de la termodinámica nos dice que las reacciones tienen direccionalidad

Hasta el momento, todo lo que la termodinámica ha podido decirnos es que la energía se conserva cuando sucede un proceso o una reacción —que toda la energía que entra en un sistema debe o ser almacenada dentro del sistema o liberada de nuevo al entorno. Hemos visto la utilidad del ΔH como una medida de cómo la entalpía total de un sistema cambiaría si un proceso dado ocurriese, pero no tenemos todavía una forma de predecir si el proceso ocurrirá de hecho, y en qué medida bajo las condiciones reinantes.

Tenemos, al menos en algunos casos, una idea intuitiva de que algunas reacciones o procesos son posibles, mientras que otros no. En cualquier caso, estamos bastante seguros de que si acercamos una cerilla a una hoja de papel, se quemará. La oxidación de celulosa a dióxido de carbono y agua es, en otras palabras, una reacción posible. O, para utilizar una terminología más precisa, es una reacción *espontánea termodinámicamente*. En el contexto de la termodinámica, el término *espontáneo* tiene un significado específico, restringido que es diferente de su uso corriente. La **espontaneidad termodinámica** es una medida de si la reacción o el proceso *puede producirse* pero no dice nada de si *se producirá*. Nuestra hoja de papel ilustra bien este punto. La oxidación de la celulosa es claramente una reacción posible, pero sabemos que no pasa «porque sí»; necesita algún impulso —una cerilla, en este caso concreto—.

No sólo estamos convencidos de que la hoja de papel se quemará si se enciende, sino que sabemos, aunque sólo sea intuitivamente, que existe direccionalidad en la propiedad. En otras palabras, estamos igualmente convencidos de que la reacción contraria no ocurrirá —de que si nos quedásemos sujetando los restos carbonizados, el papel no se volve-

ría a unir en nuestras manos de manera espontánea—. En otras palabras, tenemos una idea tanto de la *posibilidad* como de la *direccionalidad* de la oxidación de la celulosa.

Probablemente puede pensar en otros procesos para los cuales se puedan hacer estas predicciones termodinámicas con igual seguridad. Sabemos, por ejemplo, que las gotas de colorante difunden en el agua, que los cubos de hielo se funden a temperatura ambiente y que el azúcar se disuelve en el agua y podemos además definir estos acontecimientos como termodinámicamente espontáneos. Pero si preguntamos por qué los reconocemos como tales, la respuesta tiene que ver con experiencias previas repetidas. Hemos visto quemar papel, fundirse cubitos de hielo y disolverse azúcar, el suficiente número de veces como para saber, de forma intuitiva, que son procesos que realmente ocurren y tan predecibles que los podemos etiquetar como espontáneos conociendo simplemente las condiciones.

Sin embargo, cuando nos trasladamos del mundo de los procesos físicos familiares a la esfera de las reacciones químicas en las células, rápidamente descubriremos que no podemos depender de experiencias previas a la hora de guiarnos en nuestras predicciones. Considere, por ejemplo, la conversión de glucosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato:

$$\text{glucosa-6-fosfato} \rightleftharpoons \text{fructosa-6-fosfato} \qquad \textbf{(5.6)}$$

La glucosa es una aldosa de seis carbonos y la fructosa es su equivalente ceto (*véase* Figura 3.21). Las dos pueden formar un enlace fosfoéster entre una molécula de ácido fosfórico (fosfato) y el grupo hidroxilo del carbono 6 del azúcar, dando lugar a compuestos fosforilados. La Reacción 5.6 implica además la ínterconversión de un aldoazúcar fosforilado y el correspondiente cetoazúcar fosforilado, como se muestra en la Figura 5.8.

Esta particular interconversión es una reacción importante en todas las células. De hecho, es el segundo paso de una secuencia de reacciones importante y universal denominada vía glicolítica. Además de ilustrar un principio termodinámico importante, la Reacción 5.6 nos introduce un poco en la química celular, lo que nos resultará útil más tarde. Por el momento, sin embargo, vamos a centrarnos en la reacción desde un punto de vista termodinámico, y en preguntarnos qué predicciones se pueden hacer acerca de la probabilidad de que la glucosa-6-fosfato se convierta en fructosa-6-fosfato. Probablemente no sabrá hacer predicciones de ningún tipo. Sabemos lo que pasará con el papel quemado o con el hielo fundido, pero nos falta la familiaridad y la experiencia previa con los azúcares fosforilados como para hacer una suposición inteligente. Claramente, lo que necesitamos es un medio fiable para determinar si un cambio físico o químico puede suceder bajo condiciones específicas sin tener que depender de experiencias previas, de la familiaridad o de la intuición.

La termodinámica nos proporciona exactamente esa medida de espontaneidad en la **segunda ley de la termodinámica** o la *ley de la espontaneidad termodinámica.* Como veremos en breve, la segunda ley se puede expresar de diferentes maneras. Sin embargo, la más sencilla es la que nos dice que *en cada cambio físico o químico, el universo siempre tiende hacia el mayor desorden o aleatoriedad.* La segunda ley es útil para nuestros propósitos porque nos permite predecir en qué dirección puede discurrir una reacción en condiciones específicas, cuánta energía liberará la reacción si se realiza y cómo afectarán a los valores energéticos de la reacción los cambios específicos de las condiciones.

Un punto importante a destacar es que *ningún proceso ni reacción desobedece la segunda ley de la termodinámica.*

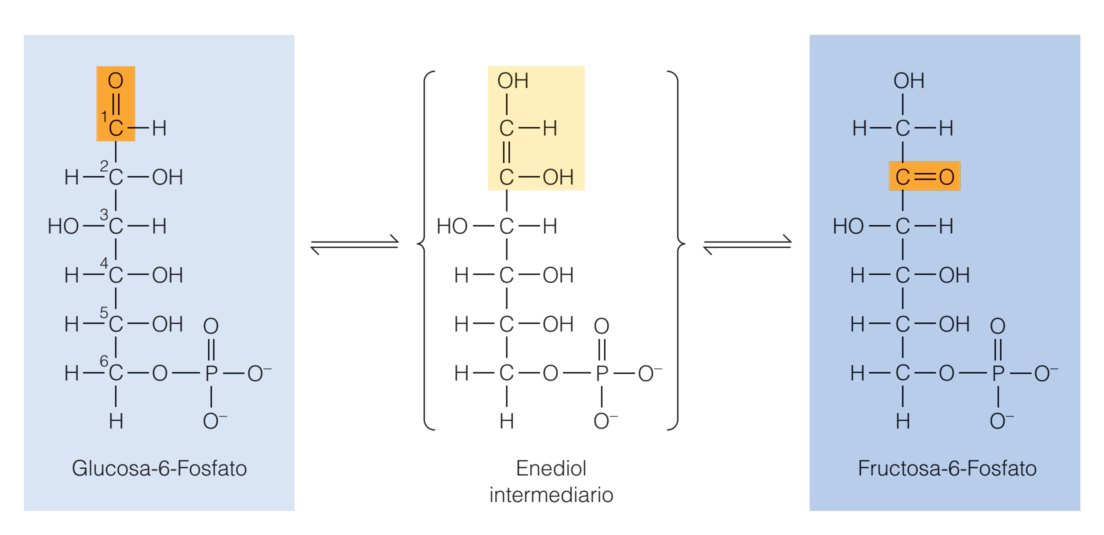


Figura 5.8 La interconversión de glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato. Esta reacción implica la interconversión de las formas fosforiladas de un aldoazúcar (glucosa) y un cetoazúcar (fructosa). La reacción se cataliza por una enzima denominada fosfoglucoisomerasa y es fácilmente reversible. La reacción se produce por medio de un intermediario, denominado enediol que se une a la enzima, ya que tiene un doble enlace carbono-carbono («ene») con dos grupos alcoholes («diol») unidos. Esta reacción es parte de la vía glicolítica, como veremos en el Capítulo 9.

Algunos procesos puede parecer que lo hacen porque obtienen como resultado más orden en vez de menos. Piense, por ejemplo, en el aumento del orden cuando se construye una casa, cuando se limpia una habitación o cuando un ser humano se desarrolla a partir de un óvulo. En cada uno de estos casos, sin embargo, el aumento del orden se limita a un sistema específico (la casa, la habitación o el embrión) y es posible solamente porque es un sistema abierto, de manera que la energía se puede añadir desde el exterior por medio de una sierra eléctrica, los músculos de tus brazos o por los nutrientes que aporta la madre. El aporte de energía significa a su vez que se está produciendo un desorden mayor en otro lugar del universo, como el agua que fluye a través de las turbinas de una planta hidroeléctrica para impulsar la sierra, por ejemplo, o como que consuma y digiera una bolsa de patatas fritas para impulsar los músculos de sus brazos.

La entropía y la energía libre son dos medios alternativos para evaluar la espontaneidad termodinámica

La espontaneidad termodinámica —si una reacción *puede* producirse— puede medirse por las variaciones en cualquiera de estos dos parámetros: *entropía* o *energía libre*. Estos conceptos son abstractos y pueden ser algo difíciles de entender. Por tanto, limitaremos nuestra discusión a su uso en la determinación de qué cambios pueden producirse en los sistemas biológicos. Como ayuda adicional *véase* el Anexo 5A para un ensayo que usa frijoles saltarines para introducir los conceptos de energía interna, entropía y energía libre.

Entropía. Aunque no podemos percibir la **entropía** directamente, nos podemos hacer una idea de ella considerándola como una medida de *aleatoriedad* o *desorden*. La entropía se representa por el símbolo ***S***. Para cualquier sistema, el *incremento de entropía*, ΔS, representa un cambio en el grado de aleatoriedad o desorden de los componentes del sistema. Por ejemplo, la combustión del papel implica un aumento de la entropía porque los átomos de carbono, oxígeno e hidrógeno de la celulosa una vez convertidos en dióxido de carbono y agua están distribuidos mucho más aleatoriamente en el espacio. La entropía también aumenta al fundirse el hielo o cuando se deja evaporar un solvente volátil como la gasolina.

La variación de la entropía como medida de la espontaneidad termodinámica. ¿Cómo puede la segunda ley de la termodinámica ayudar a predecir qué cambios ocurrirán en una célula? Hay una relación muy importante entre los sucesos espontáneos y las variaciones de la entropía porque siempre que ocurre un proceso en la naturaleza, la aleatoriedad o desorden del universo (es decir, la entropía del universo) aumenta invariablemente. Ésta es una de las dos maneras alternativas de expresar la segunda ley de la termodinámica. De acuerdo con esta formulación, *todos los procesos o reacciones que ocurren espontáneamente producen un aumento en la entropía total del universo*. O, en otras palabras *el valor de* $\Delta S_{universo}$ *es positivo para todo proceso o reacción real*.

Tenemos que recordar, sin embargo, que esta formulación de la segunda ley se refiere al universo como un todo y podría no ser aplicable al sistema específico en consideración. Todo proceso real, sin excepción, debe acompañarse de un aumento de la entropía del universo, pero para un sistema dado, la entropía puede aumentar, disminuir o permanecer igual como resultado de un proceso específico. Por ejemplo, la combustión del papel es claramente espontánea y se acompaña de un *aumento* de la entropía del sistema. Por otro lado, la congelación del agua a −0,1 °C es también un suceso espontáneo aunque implica una *disminución* en la entropía del sistema. Esto tiene sentido cuando se considera el mayor orden de las moléculas de agua en los cristales de hielo. Por tanto, mientras que el cambio en la entropía del universo es una medida válida de la espontaneidad de un proceso, el cambio en la entropía de un sistema no lo es.

Expresar la segunda ley en términos de variación de la entropía tiene por tanto un valor limitado para predecir la espontaneidad de los procesos biológicos, ya que requeriría registrar los cambios que ocurren no sólo dentro del sistema sino también en su entorno. Sería mucho más conveniente un parámetro que permitiera la predicción de la espontaneidad de las reacciones a partir de la consideración del sistema solamente.

Energía libre. Como puede suponer, existe solamente una medida de la espontaneidad para el sistema. Se llama **energía libre** y fue representada con el símbolo ***G***, por Willard Gibbs, quien fue el primero en desarrollar el concepto. Dado su valor predictivo y su facilidad de cálculo, *la función de energía libre es uno de los conceptos termodinámicos más útiles en biología*. Podríamos incluso argumentar que toda nuestra discusión sobre termodinámica hasta aquí ha sido en realidad una manera de llevarnos hasta la energía libre, ya que es aquí donde se hace aparente la utilidad de la termodinámica para los biólogos celulares.

Como la mayoría de las demás funciones termodinámicas la energía libre se define sólo en términos de relaciones matemáticas. Pero para sistemas biológicos a presión, volumen y temperatura constantes, la **variación de la energía libre**, D*G*, se relaciona con las variaciones de la entalpía y la entropía por la fórmula

$$\Delta H = \Delta G + T\Delta S \quad (5.7)$$

o

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (5.8)$$

donde ΔH es el incremento de entalpía, ΔG es la variación de la energía libre, ΔS es el cambio en la entropía, y T es la temperatura del sistema en grados Kelvin (K = °C + 273).

Los frijoles saltarines y la energía libre

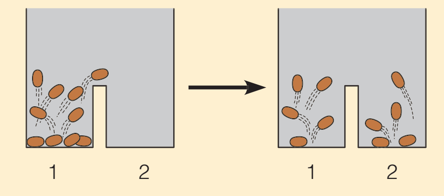
Si considera que los conceptos de energía libre, entropía y constante de equilibrio son difíciles de comprender, quizás una simple analogía podría ayudar*. Para ello, necesitaremos un puñado imaginario de frijoles saltarines, que son en realidad semillas de algunos arbustos mexicanos, con larvas en su interior de la polilla *Laspeyresia saltitans.* Cuando la larva que se encuentra en el interior de la semilla se mueve, las semillas se mueven también. La acción de «saltar» probablemente sirve para alejar a la larva de la luz directa del sol, que la calentaría hasta temperaturas letales.

La reacción de saltar

Para ilustrarlo, imagine que tenemos frijoles saltarines altamente activos en dos cámaras separadas por un pequeño tabique como se muestra en la figura. Observe que las cámaras tienen la misma superficie de suelo y están al mismo nivel, aunque variaremos ambas propiedades en breve. Tan pronto como situemos un puñado de frijoles saltarines en la cámara número 1, empezarán a saltar de manera aleatoria. Aunque la mayoría de los frijoles saltarán sólo a una altura moderada la mayor parte del tiempo, de manera ocasional, alguna de ellas, en un alarde de ambición, dará un salto más energético, vencerá la barrera y caerá en la cámara número 2. Lo escribiremos como la *reacción de salto:*

$$\text{Frijoles en la cámara 1} \rightleftharpoons \text{Frijoles en la cámara 2}$$

Imaginemos esto como un acontecimiento absolutamente aleatorio, que sucede a intervalos irregulares y poco frecuentes. Ocasionalmente uno de los frijoles que ha alcanzado la cámara número 2 casualmente salta hacia la cámara número 1, lo que supondría la reacción contraria. Al principio, por supuesto, habrá más frijoles saltando de la cámara 1 a la 2 ya que hay más frijoles en la cámara 1, pero las cosas finalmente se repartirán por igual, de forma que, aproximadamente, habrá el mismo número de frijoles en los dos compartimentos. El sistema estará entonces en *equilibrio.* Los frijoles todavía continuarán saltando entre las dos cámaras, pero el número de ellos saltando en las dos direcciones será el mismo.



La constante de equilibrio

Una vez que nuestro sistema está en equilibrio, podemos contar el número de frijoles en cada cámara y expresar el resultado como el cociente entre el número de frijoles en la cámara 2 y el número de frijoles en la cámara 1. Esto es, sencillamente, la *constante de equilibrio* K_{eq} para la reacción de salto:

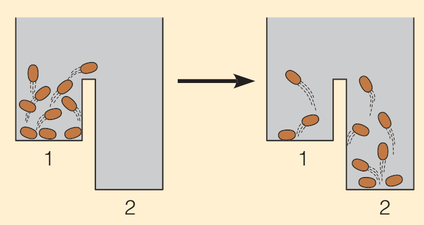
$$K_{eq} = \frac{\text{número de frijoles en la cámara 2 en el equilibrio}}{\text{número de frijoles en la cámara 1 en el equilibrio}}$$

* *Agradecemos a Princeton University Press la autorización para usar esta analogía, que Harold F. Blunt desarrolló por primera vez en el libro* Time's arrow and Evolution (*3rd ed, 1968*), *pp. 17-26.*

Para el caso concreto mostrado en la columna anterior, el número de frijoles en las dos cámaras es el mismo en el estado de equilibrio, de forma que la constante de equilibrio para la reacción de salto en estas condiciones es 1.0.

Variaciones de entalpía (ΔH)

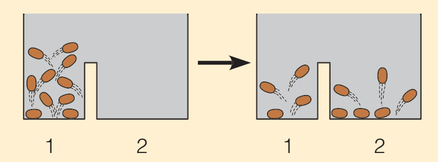
Ahora supongamos que el nivel de la cámara 1 está algo más alto que el de la cámara 2, como se muestra en el siguiente diagrama. Los frijoles colocados en la cámara 1 tenderán de nuevo a distribuirse entre las cámaras 1 y 2, pero en esta ocasión se necesita un salto mayor para pasar de la cámara 2 a la cámara 1 que para pasar de la 1 a la 2, de forma que esto último pasará con mayor frecuencia. El resultado será que habrá más frijoles en la cámara 2 que en la 1 en el equilibrio. Y la constante de equilibrio será por tanto mayor que 1.



Las alturas relativas de las dos cámaras se pueden considerar como medidas de la *entalpía*, o *contenido de calor* (H), de la cámara, por lo que la cámara 1 tiene un valor de H más alto que el de la cámara 2, y la diferencia entre ellas se representa como ΔH. Ya que el salto de la cámara 1 a la cámara 2 es más fácil, tiene sentido que el ΔH tenga un valor negativo para la reacción de salto de la cámara 1 a la cámara 2. De manera similar, parece razonable que ΔH para la reacción contraria tendría un valor positivo porque el salto es más empinado.

Variaciones de entropía (ΔS)

Hasta el momento, parecería que la única cosa que puede afectar a la distribución equilibrada de los fríjoles entre las dos cámaras es la diferencia en la entalpía, ΔH. Pero, eso es sólo porque hemos mantenido constante el área del suelo de las dos cámaras. Imagine, en cambio, la situación que se muestra debajo, donde las dos cámaras tienen otra vez la misma altura, pero ahora la cámara 2 tiene un área del suelo mayor que la cámara 1. De acuerdo con esto, la probabilidad de que un frijol se encuentre en la cámara 2 es por tanto mayor, por lo que habrá más frijoles en la cámara 2 que en la cámara 1 en el equilibrio, y la constante de equilibrio, también en este caso, será mayor que 1. Esto quiere decir que la posición de equilibrio de la reacción de salto se ha desplazado hacia la derecha, incluso aunque no haya cambio de entalpía.



El área del suelo de las cámaras puede imaginarse como una medida de la *entropía* o aleatoriedad del sistema, S, y la *diferencia* entre las dos cámaras puede representarse como ΔS.

Dado que la cámara 2 tiene una superficie de suelo mayor que la cámara 1, la variación de la entropía es positiva para la reacción de salto cuando se produce de izquierda a derecha en estas condiciones. Fíjese en que para ΔH los valores negativos se asocian con reacciones favorables, mientras que para ΔS las reacciones favorables se indican con valores positivos.

Incremento de la energía libre (ΔG)

Hasta ahora hemos encontrado dos factores diferentes que afectan a la distribución de los frijoles: la diferencia de nivel entre las dos cámaras (ΔH) y la diferencia en la superficie del suelo (ΔS). Además, debe quedar claro, que ninguno de esos factores por sí mismo es un indicador adecuado de cómo se distribuirán los frijoles en el equilibrio, porque un ΔH favorable (negativo) puede ser revertido de sobra por un ΔS desfavorable (negativo), y un ΔS favorable (positivo) podría ser revertido de sobra por un ΔH desfavorable (positivo). Se podría de hecho diseñar condiciones de las cámaras que ilustrasen ambas situaciones, así como situaciones en las que ΔH y ΔS tienden a reforzarse más que a contrarrestarse.

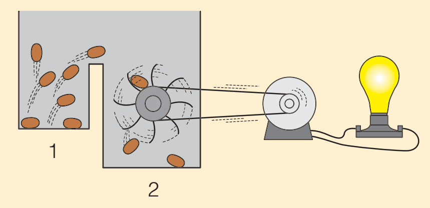
Claramente, lo que necesitamos es sumar algebraicamente esos dos efectos para ver cuál será la tendencia neta. La nueva medida que aparece se llama *incremento de la energía libre*, ΔG, que resulta ser el parámetro termodinámico más importante para nuestros propósitos. ΔG se define de manera que los valores *negativos* corresponden a reacciones favorables (es decir, espontáneas termodinámicamente) y los valores *positivos* representan reacciones desfavorables. Por tanto, ΔG debe tener el *mismo* signo que ΔH (ya que un ΔH negativo es también favorable), pero el signo *contrario* que ΔS (ya que para ΔS el signo positivo es favorable). En términos de termodinámica de la vida real, la expresión de ΔG en términos de ΔH y ΔS es:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

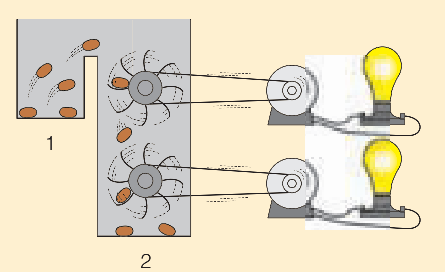
(Fíjese en que la dependencia de la temperatura de ΔS es la única característica de esta fórmula que no puede ser explicada fácilmente por nuestro modelo, a no ser que se asuma que el efecto de los cambios en el tamaño de la cámara sea de alguna forma mayor a temperaturas más altas.)

ΔG y la capacidad de realizar trabajo

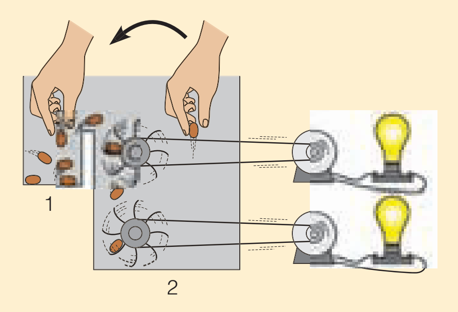
Debería poder apreciar la dificultad de sugerir un equivalente físico de ΔG ya que representa la suma algebraica de las variaciones de entropía y de energía, que pueden reforzarse o contrarrestarse parcialmente entre sí. Pero mientras ΔG sea negativa los frijoles continuarán saltando desde la cámara 1 hacia la cámara 2 tanto si son empujadas principalmente por cambios de la entropía, de la energía interna, o de ambas.



Esto significa que si colocamos algún tipo de «rueda de frijoles» movida por frijoles entre las dos cámaras, como se muestra abajo, el movimiento de los frijoles de una cámara hacia la otra puede aprovecharse para realizar trabajo hasta que se alcance el equilibrio, punto en el cual no es posible ningún trabajo adicional. Además, cuanto mayor sea la diferencia de energía libre entre las dos cámaras (es decir, cuanto más negativa sea ΔG) más trabajo podrá realizar el sistema.



Por tanto, ΔG es en primer lugar y sobre todo una medida de la capacidad de un sistema para realizar trabajo bajo condiciones específicas. De hecho, se podría pensar en ΔG como la energía libre en el sentido de la *energía que está libre o disponible para realizar trabajo útil*. Además, si conseguimos mantener ΔG negativa añadiendo frijoles continuamente a la cámara 1 y quitándolos de la cámara 2, tendremos un *estado estable* dinámico, una condición que aprovecha eficazmente la tendencia inexorable a alcanzar el equilibrio. El trabajo puede ser realizado entonces continuamente por los frijoles que están siempre saltando hacia el equilibrio pero que nunca lo alcanzan en realidad.



Mirando hacia delante

Para anticiparnos a la transición entre la termodinámica de este capítulo a la cinética del siguiente, empiece a pensar sobre la *velocidad* a la que los frijoles pasan de la cámara 1 a la cámara 2. Claramente, ΔG mide cuánta energía se liberará si los frijoles saltan, pero no dice nada en absoluto sobre la velocidad. Ésta parecería depender de forma crítica de la altura de la barrera entre las dos cámaras. Considere esto como la *barrera de la energía de activación*, y piense entonces en medios por los cuales pudiera hacer que los frijoles se moviesen sobre la barrera más rápidamente. Un enfoque podría ser calentar las cámaras, esto sería eficaz ya que las larvas de dentro de las semillas se mueven más vigorosamente si se las calienta. Las células, por su parte, disponen de un medio mucho más efectivo y específico de acelerar las reacciones: rebajan la barrera de activación usando catalizadores llamados *enzimas*, que encontraremos en el siguiente capítulo.

Fíjese en que ΔG es la suma algebraica de dos términos, ΔH y $-T\,\Delta S$. Al igual que ΔH, ΔS para una reacción o proceso específico puede ser positiva (aumento de la entropía) o negativa (disminución de la entropía). Debido al signo menos, el término $-T\,\Delta S$ será negativo si la entropía aumenta o positivo si la entropía disminuye.

Visto esto, los valores para ΔH y $-T\,\Delta S$ pueden ser positivos o negativos, con lo que el valor de ΔG para una reacción dada dependerá de los valores numéricos y los signos de los términos ΔH y $-T\,\Delta S$ (Figura 5.9). Los términos se sumarán si los dos tienen el mismo signo, positivo (Figura 5.9a) o negativo (Figura 5.9b). De esta forma, una reacción exotérmica (es decir, ΔH es negativa) y que produce un incremento de la entropía (es decir, ΔS es positiva y $-T\,\Delta S$ es negativa) tiene un valor de ΔG que es la *suma* de dos términos negativos y es por eso más negativa que cada término (Figura 5.9b). Sin embargo, si los términos ΔH y $-T\,\Delta S$ difieren en signo, el valor de ΔG tendría el signo del más grande, pero su valor será la *diferencia* numérica entre los dos términos. Por eso, una reacción que es endotérmica (es decir, ΔH es positivo), y tiene como resultado un aumento de la entropía (es decir, ΔS es positivo y $-T\,\Delta S$ es negativo), tiene un valor de ΔG que es positivo (Figura 5.9c) o negativo (Figura 5.9d), dependiendo de los valores numéricos de ΔH y $-T\,\Delta S$.

La variación de la energía libre es una medida de la espontaneidad termodinámica. La energía libre es un concepto de extraordinaria utilidad y de fácil medida como indicador de la espontaneidad. Como veremos en breve, ΔG para una reacción se puede calcular con facilidad a partir de la constante de equilibrio para la reacción y a partir de variables del sistema de fácil medida, tales como las concentraciones de reactivos y productos. Una vez determinado, ΔG proporciona exactamente lo que hemos estado buscando: una medida de la espontaneidad de una reacción basada únicamente en las propiedades del sistema en el que están ocurriendo las reacciones.

Cada reacción espontánea se caracteriza de forma específica, por una *disminución* en la energía libre del sistema ($\Delta G_{sistema} < 0$), así como por un *aumento* de la entropía del universo ($\Delta S_{universo} > 0$). Esto es verdad porque, con la temperatura y la presión constantes, ΔG para un sistema está relacionado con ΔS para el universo de una manera simple e inversa. Esto nos proporciona una segunda forma igualmente válida para expresar la segunda ley: *Todos los procesos o reacciones que suceden de manera espontánea obtienen como resultado una disminución de la energía libre del sistema.* En otras palabras, *el valor para el $\Delta G_{sistema}$ es negativo para cada reacción o proceso real.*

Tales procesos o reacciones se denominan **exergónicos**, que quiere decir *liberadores de energía.* Fíjese cuidadosamente en que se refiere específicamente a la variación en la energía libre y no a variaciones de la entalpía o de la entropía del sistema; estos valores pueden ser negativos, positivos, o cero para una reacción dada y por tanto *no* son medidas válidas de la espontaneidad. En cambio, cualquier proceso o reacción que tuviese como resultado un aumento de la energía libre del sistema se denomina **endergónico** (que requiere energía) y no puede continuar bajo las condiciones para las que se había calculado ΔG.

Un ejemplo biológico de una reacción exergónica sería la oxidación de glucosa a dióxido de carbono y agua:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O + \text{energía} \qquad \textbf{(5.9)}$$

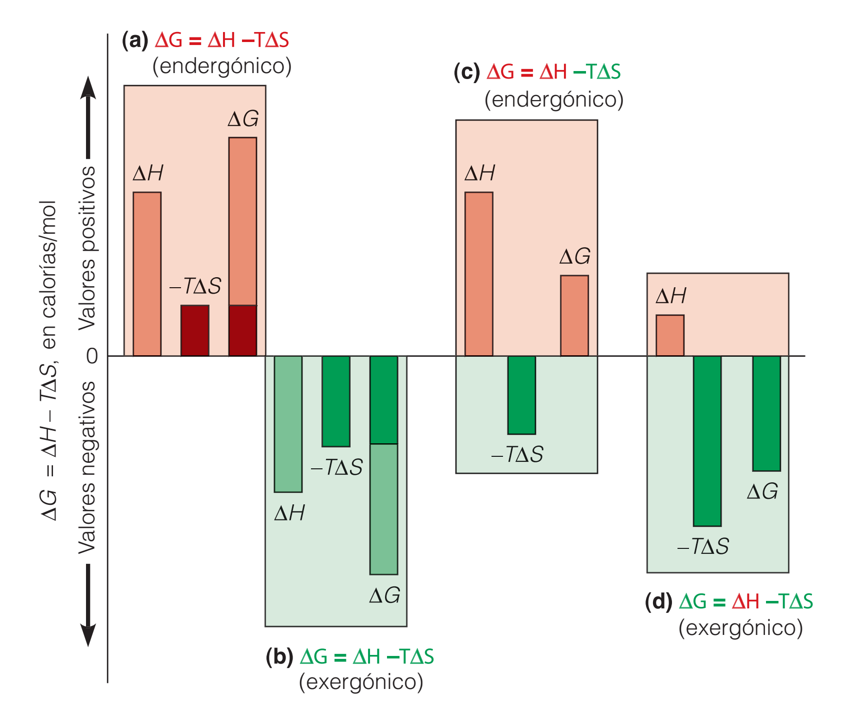


Figura 5.9 ΔG depende de los signos y valores numéricos de ΔH y del término ($-T\,\Delta S$). El valor de ΔG para un proceso específico o reacción es la suma algebraica de la variación en la entalpía (ΔH) y del término entropía dependiente de temperatura ($-T\,\Delta S$). Cuando ambos ΔH y $-T\,\Delta S$ tienen el mismo signo, el valor numérico de ΔG será la *suma* de los dos términos, si los dos términos son (**a**) positivos o (**b**) negativos. Cuando los dos términos difieren en el signo, el valor numérico de ΔG será la *diferencia* entre los dos términos, tanto si esto resulta en un ΔG que tenga (**c**) valor positivo como (**d**) valor negativo. Las letras en verde identifican términos que tienen valores negativos, mientras que las letras rojas identifican términos que tienen valores positivos.

Esta reacción se puede reconocer como la ecuación que resume el proceso de respiración aerobia, a través de la cual los quimiótrofos obtienen energía a partir de la glucosa. (La mayoría de las células de su cuerpo están realizando este proceso en este momento.) Nos encontraremos otra vez con esta reacción cuando tratemos la respiración aerobia en el Capítulo 10; por ahora nuestro interés se centra en la energética de la oxidación de la glucosa. Como ilustra la Figura 5.10a, la oxidación de la glucosa es un proceso altamente exergónico, con un valor de ΔG altamente negativo. En la combustión de la glucosa en condiciones estándar de temperatura, presión y concentración, se puede demostrar que por cada mol de glucosa oxidada se liberan 673 kcal de calor, lo que quiere decir que ΔH para la citada reacción es de -673 kcal/mol. El término $-T\,\Delta S$ se puede determinar de manera experimental y se sabe que corresponde a -13 kcal/mol a 25 °C, de manera que se trata de un ejemplo de una reacción en la que los términos ΔH y $-T\,\Delta S$ se suman, con un ΔG de -686 kcal/mol.

Ahora consideremos la reacción contraria, mediante la que los fotótrofos sintetizan azúcares como la glucosa a partir de dióxido de carbono y agua, liberando oxígeno:

$$6CO_2 + 6H_2O + \text{energía} \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \qquad \textbf{(5.10)}$$

Como puede suponer, los valores para ΔH, ΔS e ΔG para esta reacción son idénticos en magnitud, pero opuestos en signo, cuando se calculan en condiciones estándar y se comparan con los valores correspondientes para la Reacción 5.9. Concretamente, esta reacción tiene un valor de ΔG de $+686$ kcal/mol, lo que la convierte en una reacción altamente endergónica (Figura 5.10b). Por eso, los fotótrofos tienen que utilizar grandes cantidades de energía para impulsar esta reacción en la dirección de la síntesis de glucosa, y es ahí donde interviene la energía solar, como veremos cuando lleguemos al Capítulo 11.

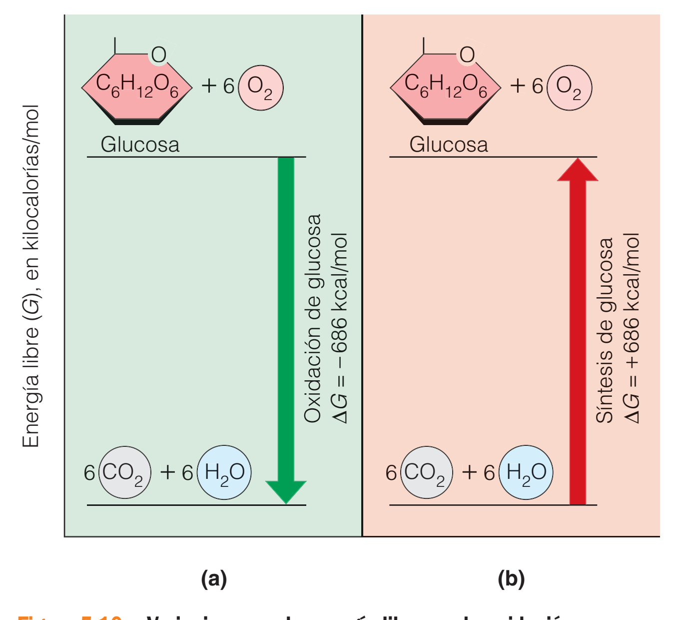


Figura 5.10 Variaciones en la energía libre por la oxidación y síntesis de glucosa. (a) La oxidación de glucosa a dióxido de carbono y agua es una reacción altamente exergónica, con un valor de ΔG, en condiciones estándar, de -686 kcal/mol. Este valor se calcula sumando los términos de ΔH y $-T\,\Delta S$, los cuales, en condiciones estándar tienen los siguientes valores respectivamente -673 kcal/mol y -13 kcal/mol. El valor altamente negativo de ΔH se debe a la oxidación de muchos enlaces C—O y C—C de la molécula de glucosa. El valor negativo del término $-T\,\Delta S$ significa que ΔS tiene que ser positivo, lo que concuerda con la mayor aleatoriedad que sería de esperar cuando los átomos de carbono, oxígeno e hidrógeno de una única molécula de glucosa se convirtieran en 6 moléculas de dióxido de carbono y en 6 moléculas de agua. (b) La síntesis de glucosa a partir de dióxido de carbono y de agua es altamente endergónica y la oxidación de glucosa es altamente exergónica. El valor de ΔG de $+686$ kcal/mol en condiciones estándar es la suma de los términos ΔH y $-T\,\Delta S$, que tienen valores de $+673$ kcal/mol y de 13 kcal/mol respectivamente.

El significado de espontaneidad. Antes de considerar cómo se calcula en realidad ΔG y utilizarlo como una medida de la espontaneidad termodinámica, necesitamos mirar en detalle lo que significa —y lo que no significa— el término *espontáneo*. Como hemos apuntado anteriormente, la espontaneidad nos dice solamente si una reacción *puede suceder*; no dice nada en absoluto sobre si *se producirá*. Una reacción puede tener un valor de ΔG negativo y aun así no ocurrir de manera detectable. Obviamente, la celulosa del papel se quema de manera espontánea si se incendia, esto concuerda con un ΔG muy negativo de -686 kcal/mol de glucosa. Incluso en ausencia de cerillas, el papel es razonablemente estable y necesitaría cientos de años para oxidarse. De esta forma, ΔG puede en realidad darnos información sobre si una reacción o un proceso son factibles —si tiene el *potencial* para suceder—. De hecho, el que una reacción exergónica pueda producirse no depende sólo de que tenga un ΔG favorable (negativo), sino también de la disponibilidad de una vía o un mecanismo que le permita pasar del estado inicial al final. Normalmente también se requiere un aporte inicial como energía de activación, como la energía en forma de calor procedente de la cerilla que incendia el trozo de papel.

La espontaneidad termodinámica es por tanto un criterio necesario pero insuficiente para determinar si una reacción realmente ocurrirá. En el Capítulo 6, exploraremos el tema de la tasa de reacción en el contexto de las reacciones catalizadas por enzimas. Por el momento, es necesario apuntar que cuando se define una reacción como espontánea termodinámicamente, simplemente se quiere decir que es un acontecimiento energéticamente factible que liberará energía libre si se produce.

Entender el ΔG

En este capítulo, nuestro cometido final consiste en entender cómo se calcula ΔG y cómo se utiliza para valorar si una reacción puede tener lugar en determinadas condiciones. Para ello, volvamos a la reacción que convierte glucosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato (Reacción 5.6) y preguntémonos qué podemos aprender sobre la espontaneidad de la conversión en la dirección en que se ha escrito la reacción (de izquierda a derecha). La experiencia previa y la familiaridad con el proceso no nos dan pistas, ni tan siquiera resulta obvio cómo se vería afectada la entropía del universo si la reacción se desencadenase. Claramente, necesitamos poder calcular ΔG y determinar si éste es positivo o negativo bajo las condiciones particulares que especificamos para la reacción.

La constante de equilibrio es una medida de la direccionalidad

Un medio de evaluar si una reacción puede darse en una dirección concreta en condiciones específicas implica a la **constante de equilibrio K_{eq}**, que es la relación entre las concentraciones de los productos y de los reactivos en equilibrio. En una reacción general en la que A se convierte reversiblemente en B, la constante de equilibrio es simplemente la relación de las concentraciones de equilibrio de A y B:

$$A \rightleftharpoons B \quad \textbf{(5.11)}$$

$$K_{eq} = \frac{[B]_{eq}}{[A]_{eq}} \quad \textbf{(5.12)}$$

en donde $[A]_{eq}$ y $[B]_{eq}$ son las concentraciones de A y B, en moles por litro, cuando la Reacción 5.11 está en equilibrio a 25 °C. Si se conoce la constante de equilibrio para una reacción, se puede decir con facilidad si una mezcla específica de productos y reactivos está en equilibrio, y si no, cuán alejada del equilibrio está y en qué dirección debe desplazarse para alcanzar ese equilibrio.

Por ejemplo, se sabe que la constante de equilibrio para la Reacción 5.6 a 25 °C es de 0,5. Esto quiere decir que, en el equilibrio, habrá la mitad de fructosa-6-fosfato que de glucosa-6-fosfato, independientemente de las magnitudes reales de las concentraciones:

$$K_{eq} = \frac{[\text{fructosa-6-fosfato}]_{eq}}{[\text{glucosa-6-fosfato}]_{eq}} = 0{,}5 \quad \textbf{(5.13)}$$

Si los dos componentes están presentes en cualquier otra proporción de concentraciones, la reacción no estará en equilibrio y tenderá hacia (será termodinámicamente espontánea en la dirección de) el equilibrio. De esta forma, una relación de concentraciones *menor* que la K_{eq} significa que hay poca fructosa-6-fosfato a expensas de la glucosa-6-fosfato. A la inversa, una relación de concentraciones *mayor* que la K_{eq} indica que la concentración relativa de fructosa-6-fosfato es demasiado elevada y que la reacción tenderá a desplazarse hacia la izquierda.

La Figura 5.11 ilustra este concepto para la interconversión de A y B (Reacción 5.11), mostrando las relaciones entre la energía libre de la reacción y a qué distancia del equilibrio se encuentran las concentraciones de A y de B. (Fíjese en que se asume en la ilustración un valor de K_{eq} de 1,0; para otros valores de K_{eq}, la curva sería la misma pero los valores del eje x serían diferentes.)

La cuestión clave de la Figura 5.11 está clara: la energía libre es más baja en el equilibrio y aumenta a medida que el sistema se desplaza desde el equilibrio en cualquier dirección. Además, si conocemos la relación de concentraciones actual y la comparamos con la relación de concentraciones en el equilibrio, se podrá predecir en qué dirección tenderá a desplazarse *y* cuánta energía libre se liberará en el proceso. De esta manera, *la tendencia a alcanzar el equilibrio proporciona la fuerza impulsora en toda reacción química*, y comparar las relaciones de concentración actuales y en equilibrio nos proporciona una medida de esa tendencia.

El Δ*G* se puede calcular con facilidad

No debe sorprendernos que ΔG sea una medida para calcular a qué distancia del equilibrio se encuentra una reacción en unas condiciones específicas y cuánta energía liberaría si la reacción se desplazara para alcanzarlo. Tampoco debería sorprendernos que para calcular ΔG se necesite co-

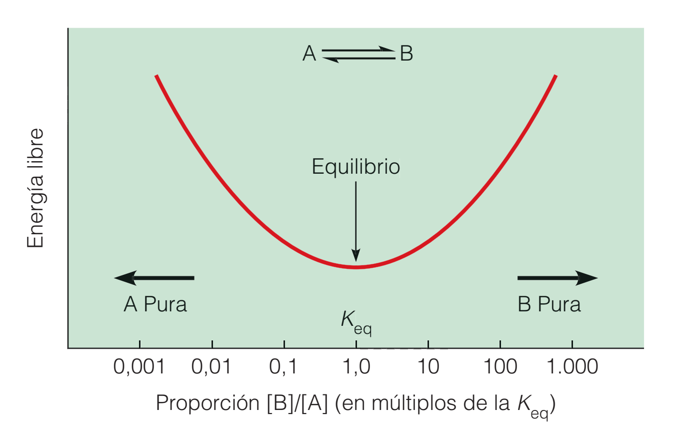


Figura 5.11 Energía libre y equilibrio químico. La cantidad de energía libre disponible a partir de una reacción química, depende de lo alejados que estén los componentes del equilibrio. Esto se ilustra aquí con una reacción que interconvierte A y B y que tiene una constante de equilibrio K_{eq}, de 1,0. La energía libre del sistema aumenta a medida que la proporción [B]/[A] cambia a cada lado del punto de equilibrio. Fíjese en que el eje de las x está en una escala exponencial, con las proporciones [B]/[A] expresadas en múltiplos de K_{eq}. Fíjese también que para una reacción con un valor de K_{eq} distinto de 1,0, el gráfico tendría la misma forma, pero estaría centrado sobre el valor de la K_{eq} para esa reacción.

nocer tanto la constante de equilibrio como las concentraciones actuales de reactivos y productos. Para la reacción 5.11, la ecuación que relaciona esas variables es

$$\Delta G = RT \ln \frac{[B]_{pr}}{[A]_{pr}} - RT \ln \frac{[B]_{eq}}{[A]_{eq}}$$

$$= RT \ln \frac{[B]_{pr}}{[A]_{pr}} - RT \ln K_{eq}$$

$$= -RT \ln K_{eq} + RT \ln \frac{[B]_{pr}}{[A]_{pr}} \qquad \textbf{(5.14)}$$

donde ΔG es la variación de la energía libre, en cal/mol en las condiciones especificadas; R es la constante de los gases (1,987 cal/mol °K); T es la temperatura en grados Kelvin (use 25 °C = 298 K si no se especifica otra cosa); ln es el logaritmo natural (es decir, en base e); $[A]_{pr}$ y $[B]_{pr}$ son las concentraciones actuales de A y de B en moles por litro; y K_{eq} es la constante de equilibrio a la temperatura estándar de 298 K (25 °C).

Generalizando, para una reacción en la cual a moléculas del reactivo A se combinan con b moléculas del reactivo B para formar c y d moléculas de los productos C y D respectivamente

$$a\text{A} + b\text{B} \rightleftharpoons c\text{C} + d\text{D} \qquad \textbf{(5.15)}$$

ΔG se calcula como

$$\Delta G = -RT \ln K_{eq} + RT \ln \frac{[C]^c_{pr}\,[D]^d_{pr}}{[A]^a_{pr}\,[B]^b_{pr}} \qquad \textbf{(5.16)}$$

donde todas las constantes y variables ya se han definido previamente y donde K_{eq} es la constante de equilibrio para la Reacción 5.15.

Volviendo a la Reacción 5.6, asumamos que las concentraciones actuales de glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato en una célula son a 25 °C de 10 μM ($10 \times 10^{-6}\ M$) y 1 μM ($1 \times 10^{-6}\ M$) respectivamente. Dado que la relación de las concentraciones actuales de los productos con respecto a la de los reactivos es de 0,1 y ya que la constante de equilibrio es de 0,5, hay poca cantidad de fructosa-6-fosfato presente con respecto a glucosa-6-fosfato para que la reacción esté en equilibrio. La reacción tendería por tanto a desplazarse hacia la derecha (en la dirección de la generación de fructosa-6-fosfato). En otras palabras, la reacción es termodinámicamente favorable en la dirección escrita. Esto, a su vez significa que ΔG es negativo en estas condiciones.

El valor real de ΔG se calcula como sigue:

$$\Delta G = -(1{,}987\ \text{cal/mol °K})(298\ \text{K}) \ln (0{,}5) + (1{,}987\ \text{cal/mol °K})(298\ \text{K}) \ln \frac{1 \times 10^{-6}\ M}{10 \times 10^{-6}\ M}$$

$$= -(592\ \text{cal/mol}) \ln (0{,}5) + (592\ \text{cal/mol}) \ln (0{,}1)$$

$$= -(592\ \text{cal/mol})(-0{,}693) + (592\ \text{cal/mol})(-2{,}303)$$

$$= +410\ \text{cal/mol} - 1364\ \text{cal/mol}$$

$$= -954\ \text{cal/mol} \qquad \textbf{(5.17)}$$

Fíjese en que nuestras esperanzas de obtener un ΔG negativo se confirman, y ahora sabemos exactamente cuánta energía libre se liberará durante la conversión espontánea de 1 mol de glucosa-6-fosfato en 1 mol de fructosa-6-fosfato en las condiciones especificadas. (Como veremos después la energía libre liberada en una reacción exergónica puede ser aprovechada para realizar trabajo o perderse en forma de calor.)

Es importante entender qué significa exactamente el valor de ΔG calculado y en qué condiciones es válido. Debido a que es un parámetro termodinámico, ΔG puede decirnos si una reacción es posible termodinámicamente tal y como está escrita, pero no dice nada acerca de la velocidad del mecanismo. Simplemente nos dice que si la reacción ocurre de hecho, lo hará hacia la derecha y liberará 954 calorías de energía libre por cada molécula de glucosa-6-fosfato que se convierta en fructosa-6-fosfato *suponiendo que* las concentraciones de ambos, reactivos y productos, *se mantengan en los valores iniciales* (10 y 1 μM respectivamente) en el transcurso de la reacción.

De manera más general, ΔG *es una medida de la espontaneidad termodinámica para una reacción en la dirección en la que está escrita (de izquierda a derecha) a las concentraciones de reactivos y productos especificadas.* En un vaso de precipitados o en un tubo de ensayo, este requerimiento de mantener constante la concentración de reactivos y productos quiere decir que los reactivos se deben añadir continuamente y que los productos se deben retirar continuamente. En la célula, cada reacción es parte de una vía metabólica, y sus reactivos y productos se mantienen en concentraciones aproximadamente constantes de no equilibrio, gracias a las reacciones que la preceden y siguen en la secuencia.

La variación estándar de la energía libre es el ΔG medido en condiciones estándar

Debido a que es un parámetro termodinámico, ΔG es independiente del mecanismo real o de la vía de una reacción, pero depende de manera decisiva de las condiciones en las que se produce la reacción. Una reacción caracterizada por una gran disminución de la energía libre bajo unas determinadas condiciones, puede tener un ΔG mucho más pequeño (aunque negativo todavía) o incluso puede tener un ΔG positivo bajo unas condiciones diferentes. La fusión del hielo, por ejemplo, depende de la temperatura; se produce espontáneamente por encima de los 0 °C, pero va en sentido opuesto (congelación) por debajo de esa temperatura. Por tanto, para un valor dado de ΔG es importante identificar las condiciones bajo las que se ha realizado la medida.

Por convención, los bioquímicos han acordado ciertas condiciones arbitrarias que definen el **estado estándar** de un sistema para facilitar la descripción, comparación y tabulación de las variaciones de la energía libre de las reacciones químicas. Para los sistemas que consisten en soluciones acuosas diluidas, se da normalmente una temperatura estándar de 25 °C (298 K), una presión de 1 atmósfera y todos los productos y reactivos deben estar presentes en sus formas más estables a una concentración estándar de 1 mol/L (o a una presión estándar de 1 atmósfera para los gases). La única excepción común a esta norma de concentración estándar es el agua. La concentración del agua en una solución acuosa diluida es de aproximadamente 55,5 *M* y no cambia de manera significativa durante el transcurso de la reacción, incluso cuando el agua es, ella misma, reactivo o producto. Por convención, los bioquímicos no incluyen la concentración de agua en los cálculos de la variación de energía libre, aunque la reacción indique un consumo o producción neta de agua.

Además de las condiciones estándar de temperatura, presión y concentración, con frecuencia los bioquímicos especifican un pH estándar de 7,0, debido a que la mayoría de las reacciones biológicas se producen a un pH neutro o muy cerca de él. La concentración de los iones de hidrógeno (y la de iones hidroxilo) es por tanto 10^{-7} *M*, de manera que la concentración estándar de 1,0 *M* no rige para los iones H^+ y OH^- cuando se especifica un pH de 7,0. Los valores de la K_{eq}, ΔG u otros parámetros termodinámicos determinados o calculados a pH 7,0 se escriben siempre con un apóstrofe (como K'_{eq}, $\Delta G'$ y así sucesivamente) para indicar este hecho.

Las variaciones de energía en las reacciones se describen visualmente estandarizadas, como el cambio que ocurriría si las reacciones se produjeran en condiciones estándar. De manera más precisa, el cambio estándar en cualquier parámetro termodinámico se refiere a la conversión de un mol de un reactivo específico en productos, o a la formación de un mol de un producto concreto a partir de los reactivos, en unas condiciones en las que la temperatura, presión, pH y concentraciones de todos los reactivos relevantes se mantienen en valores estándar.

La variación de la energía libre calculada en estas condiciones se denomina variación estándar de la energía libre y se designa como $\Delta G°'$, en donde el superíndice (°) hace alusión a condiciones estándar de temperatura, presión y concentración y el apóstrofe (′) enfatiza que para los bioquímicos, la concentración de iones hidrógeno estándar es 10^{-7} *M*, no 1,0 *M*.

Esto tiene como resultado que $\Delta G°'$ esté en relación simple con la K'_{eq} (Figura 5.12). Esta relación se ve con facilidad al reescribir la ecuación 5.16 con apóstrofes y asumiendo las concentraciones estándar para todos los reactivos y productos. Todos los términos de concentración ahora son 1,0 y el logaritmo de 1,0 es igual a cero,

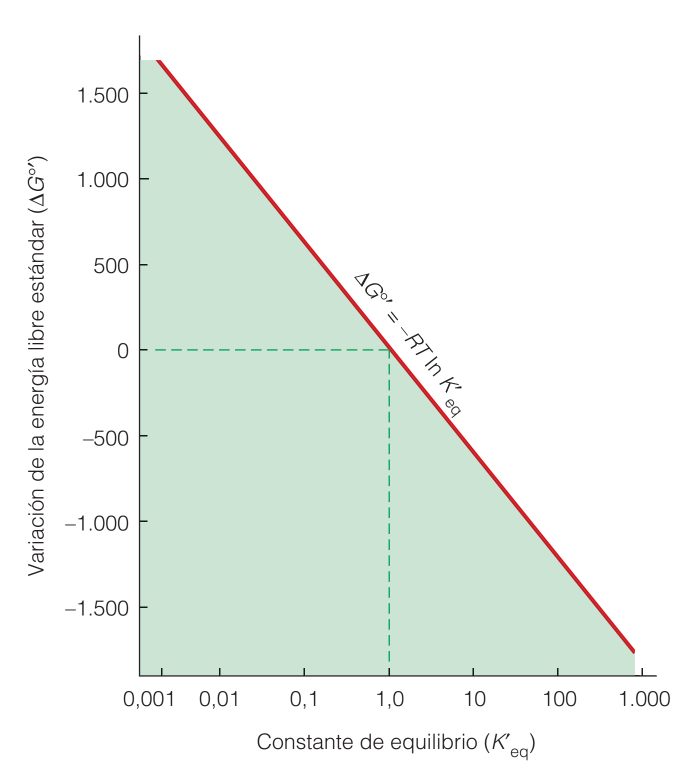


Figura 5.12 Las relaciones entre $\Delta G°'$ y K_{eq}. La variación de la energía libre estándar y la constante de equilibrio están relacionadas por la ecuación $\Delta G°' = -RT \ln K'_{eq}$. Fíjese que la constante de equilibrio está trazada en una escala exponencial. Fíjese también que si la constante de equilibrio es 1,0, la variación de la energía libre estándar es cero.

de forma que el segundo término de la expresión general para $\Delta G°'$ se elimina, y lo que queda es una ecuación para $\Delta G°'$, la variación de energía libre en condiciones estándar:

$$\Delta G°' = -RT \ln K'_{eq} + RT \ln 1 = -RT \ln K'_{eq} \quad \textbf{(5.18)}$$

En otras palabras, $\Delta G°'$ se puede calcular directamente a partir de la constante de equilibrio siempre y cuando la última se haya determinado bajo las mismas condiciones estándar de presión, temperatura y pH. Esto, en cambio, permite expresar la Ecuación 5.16 de una forma algo más sencilla como

$$\Delta G' = \Delta G°' + RT \ln \frac{[C]^c_{pr}[D]^d_{pr}}{[A]^a_{pr}[B]^b_{pr}} \quad \textbf{(5.19)}$$

A una temperatura estándar de 25 °C (298 K), el término *RT* se convierte en (1,987)(298) = 592 cal/mol, de forma que la Ecuaciones 5.18 y 5.19 se pueden reescribir como sigue, siendo éstas las fórmulas más útiles para nuestros propósitos:

$$\Delta G°' = -592 \ln K'_{eq} \quad \textbf{(5.20)}$$

$$\Delta G' = \Delta G°' + 592 \ln \frac{[C]^c_{pr}[D]^d_{pr}}{[A]^a_{pr}[B]^b_{pr}} \quad \textbf{(5.21)}$$

En resumen: significado de $\Delta G'$ y de $\Delta G°'$

Las Ecuaciones 5.20 y 5.21 representan la contribución más importante de la termodinámica a la bioquímica y a la biología celular —un medio para calcular la viabilidad de una reacción química basándose en las concentraciones actuales de productos y reactivos y en el conocimiento de la constante de equilibrio—. La Ecuación 5.20 expresa las relaciones entre las variaciones de energía libre estándar $\Delta G°'$ y la constante de equilibrio K'_{eq} y nos permite calcular la variación de energía libre asociada a una reacción de interés, si todos los reactivos y productos se mantuvieran a una concentración estándar de 1,0 *M*.

Si K'_{eq} es mayor de 1,0, entonces $\ln K'_{eq}$ sería positivo y $\Delta G°'$ será negativo, y la reacción se producirá hacia la derecha en condiciones estándar. Esto tiene sentido ya que si K'_{eq} es mayor que 1,0, en el equilibrio los productos predominarán sobre los reactivos. En el estado estándar sólo se puede alcanzar un predominio de productos por la conversión de los reactivos en productos, de manera que la reacción tendería a producirse espontáneamente hacia la derecha. En cambio, si K'_{eq} es menor que 1,0, entonces $\Delta G°'$ será positivo y la reacción no se producirá hacia la derecha. En vez de eso, la reacción tenderá a desplazarse hacia la izquierda ya que $\Delta G°'$ para la reacción inversa tendrá el mismo valor absoluto, pero con el signo opuesto. Esto concuerda con un valor bajo para K'_{eq}, que especifica que los reactivos salen favorecidos frente a los productos (esto es, que el equilibrio tiende a la izquierda).

Los valores de $\Delta G°'$ son prácticos ya que se determinan con facilidad a partir de la constante de equilibrio y porque proporcionan un criterio uniforme y aceptado por todos para describir las variaciones de energía libre. Pero tenga presente, que un valor de $\Delta G°'$ es una referencia arbitraria que hace alusión a un estado arbitrario en el que se han especificado unas condiciones de concentración que no pueden alcanzarse para la mayoría de los compuestos importantes biológicamente. Por tanto, $\Delta G°'$ es útil para descripciones estandarizadas, pero *no es una medida válida de la espontaneidad termodinámica de las reacciones ya que éstas ocurren en condiciones reales.*

Para este propósito necesitamos $\Delta G'$, que proporciona una medida directa de lo alejada que está del equilibrio una reacción a las concentraciones de reactivos y de productos que normalmente prevalecen en la célula o en otros sistemas de interés (Ecuación 5.21). Por tanto, *$\Delta G'$ es la medida más útil de la espontaneidad termodinámica.* Si es negativa, la reacción en cuestión es espontánea termodinámicamente y se producirá tal y como está escrita, bajo las condiciones para las que se realizaron los cálculos. Esta magnitud se utiliza como medida para saber cuánta energía libre se liberaría si ocurriera la reacción. Esto, a su vez, determina la máxima cantidad de trabajo que se puede realizar sobre su entorno, siempre que haya un mecanismo disponible para conservar y usar la energía a medida que se libera.

Por otro lado, un $\Delta G'$ positivo indica que la reacción no puede producirse en la dirección escrita bajo las condiciones para las que se realizaron los cálculos. Sin embargo, esas reacciones, a veces, pueden convertirse en espontáneas, debido a cambios en las concentraciones de reactivos o productos. Para el caso especial en el que $\Delta G' = 0$, la reacción está claramente en equilibrio, y ninguna variación neta de energía acompaña a la conversión de moléculas de reactivos en moléculas de productos, y viceversa. Estas características de K'_{eq}, $\Delta G°'$, y $\Delta G'$ se resumen en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1 El significado de $\Delta G°$ e $\Delta G'$

El significado de $\Delta G°'$		
$\Delta G°'$ negativo ($K'_{eq} > 1,0$)	**$\Delta G°'$ positivo ($K'_{eq} > 1,0$)**	**$\Delta G°' = 0$ ($K'_{eq} = 1,0$)**
Los productos predominan sobre los reactivos en el equilibrio a temperatura, presión y pH estándar.	Los reactivos predominan sobre los productos en el equilibrio a temperatura, presión y pH estándar.	Los productos y los reactivos están presentes a partes iguales en el equilibrio a temperatura, presión y pH estándar.
La reacción se desplaza espontáneamente hacia la derecha en condiciones estándar.	La reacción se desplaza espontáneamente hacia la izquierda en condiciones estándar.	La reacción en condiciones estándar está en equilibrio.
El significado de $\Delta G'$		
$\Delta G'$ negativo	**$\Delta G'$ positivo**	**$\Delta G' = 0$**
La reacción tal y como está escrita es factible termodinámicamente en las condiciones para las que se ha calculado $\Delta G'$	La reacción tal y como está escrita no es termodinámicamente factible en las condiciones para las que se ha calculado $\Delta G'$.	La reacción está en equilibrio en las condiciones para las que se calculó $\Delta G'$.
La reacción puede realizar trabajo en las condiciones para las que se calculó $\Delta G'$.	Hay que aportar energía que impulse la reacción en las condiciones para las que se calculó $\Delta G'$.	La reacción no puede realizar trabajo ni requiere energía en las condiciones para las que se calculó $\Delta G'$.

Variación de la energía libre: ejemplos de cálculo

Para ilustrar la manera de calcular $\Delta G'$ y $\Delta G°'$ y su utilidad, volvamos una vez más a la interconversión de glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato (Reacción 5.6). Ya sabemos que la constante de equilibrio para esta reacción bajo condiciones estándar de temperatura, pH, y presión es 0,5 (Ecuación 5.13). Esto quiere decir que si se añade a una solución de glucosa-6-fosfato a 25 °C, 1 atmósfera y pH = 7, la enzima que cataliza la reacción en las células, y se incuba hasta que la reacción se detenga, la fructosa-6-fosfato y la glucosa-6-fosfato estarán presentes en una proporción de equilibrio de 0,5. (Fíjese en que esta proporción es independiente de la concentración inicial de glucosa-6-fosfato y que se habría alcanzado igualmente bien si se hubiese iniciado la reacción con cualquier concentración de fructosa-6-fosfato o con cualquier mezcla de las dos a cualquier concentración inicial.)

La variación estándar de energía libre $\Delta G°'$ se puede calcular a partir de K'_{eq} como sigue:

$$\begin{aligned}\Delta G°' &= -RT \ln K_{eq} = -592 \ln K'_{eq}\\ &= -592 \ln 0{,}5 = -592(-0{,}693)\\ &= +410 \text{ cal/mol}\end{aligned} \qquad \textbf{(5.22)}$$

El valor positivo de $\Delta G°'$ es por tanto otra forma de expresar el hecho de que el reactivo (glucosa-6-fosfato) es la especie predominante en el equilibrio. Un valor de $\Delta G°'$ positivo también significa que en condiciones estándar de concentración, la reacción no es espontánea (es termodinámicamente imposible) en la dirección en la que está escrita. En otras palabras, si empezamos con glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato presentes en concentraciones de 1,0 *M* no se puede producir una conversión neta de glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato.

De hecho, poniendo un catalizador apropiado, la reacción se produciría hacia la izquierda en condiciones estándar ya que $\Delta G°'$ para la reacción en esa dirección es de −410 cal/mol. Por tanto, la fructosa-6-fosfato se convertiría en glucosa-6-fosfato hasta que se alcanzase la proporción de equilibrio de 0,5. Alternativamente, si las dos especies se añadieran y se retiraran tan continuamente como fuera necesario para mantener las concentraciones de ambas a 1,0 *M*, la reacción se desplazaría y se produciría continua y espontáneamente hacia la izquierda (asumiendo la presencia de un catalizador), con la liberación de 410 cal de energía libre por mol de fructosa-6-fosfato convertida en glucosa-6-fosfato. Si no existe ningún mecanismo que conserve esta energía, se disipará como calor.

En una célula real, ninguno de estos azúcares fosforilados estará nunca presente en concentraciones que se aproximen a este 1,0 *M*. De hecho, los valores experimentales de las concentraciones habituales de estas sustancias en los glóbulos rojos humanos son los siguientes:

$$[\text{glucosa-6-fosfato}]\text{: } 83\ \mu M\ (83 \times 10^{-6}\ M)$$
$$[\text{fructosa-6-fosfato}]\text{: } 14\ \mu M\ (14 \times 10^{-6}\ M)$$

Utilizando estos valores se puede calcular el valor real de $\Delta G'$ para la interconversión de estos azúcares en los glóbulos rojos sanguíneos como sigue:

$$\begin{aligned}\Delta G' &= \Delta G°' + 592 \ln \frac{[\text{fructosa-6-fosfato}]_{eq}}{[\text{glucosa-6-fosfato}]_{eq}}\\ &= +410 + 592 \ln \frac{14 \times 10^{-6}}{83 \times 10^{-6}}\\ &= +410 + 592 \ln 0{,}169\\ &= +410 + 592(-1{,}78) = +410 - 1.054\\ &= -644 \text{ cal/mol}\end{aligned} \qquad \textbf{(5.23)}$$

El valor negativo para el $\Delta G'$ significa que la conversión de glucosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato es posible termodinámicamente en las condiciones de concentración presentes realmente en los glóbulos rojos, y que la reacción liberará 644 cal de energía libre por mol de reactivo convertido en producto. Por tanto, la conversión de reactivo en producto es imposible termodinámicamente en condiciones estándar, pero los glóbulos rojos mantienen estos dos azúcares fosforilados en las concentraciones adecuadas para revertir el $\Delta G°'$ positivo, haciendo posible la reacción. Esta reacción forma parte de la glicólisis, por lo que esta adaptación es esencial para que el glóbulo rojo realice el proceso de degradación de glucosa.

La vida y el estado estable: las reacciones que se mueven hacia el equilibrio sin llegar nunca a alcanzarlo

Como se ha resaltado en este capítulo, la fuerza impulsora de todas las reacciones es su tendencia a alcanzar el equilibrio. De hecho, $\Delta G°'$ y $\Delta G'$, no son más que medidas útiles para cuantificar en qué dirección debe producirse una reacción para alcanzar el equilibrio y a qué distancia se encuentra de éste, en determinadas condiciones dictadas por las concentraciones estándar o actuales de productos y de reactivos. Pero para entender cómo funcionan las células realmente, debemos valorar la importancia de las reacciones que se desplazan hacia el equilibrio sin llegar a alcanzarlo. En el equilibrio, las tasas de desplazamiento de la reacción hacia uno u otro lado son las mismas y no hay flujo neto de materia en ninguna dirección. Lo que es más importante, no se puede extraer energía adicional de la reacción ya que $\Delta G'$ es cero para una reacción en equilibrio.

Entonces, a efectos prácticos una reacción en equilibrio es una reacción que está detenida. Pero una célula viva se caracteriza por reacciones continuas, no detenidas. Una célula en equilibrio sería una célula muerta. Podríamos definir la vida como una lucha continua por mantener muchas reacciones celulares en posiciones lejos del equilibrio, ya que en el equilibrio no son posibles reacciones netas, no

se puede liberar energía ni se puede realizar trabajo, y el orden del estado vivo no se puede mantener.

Por tanto, la vida sólo es posible porque las células vivas se mantienen en un **estado estable**, en el cual la mayoría de sus reacciones están alejadas del equilibrio termodinámico. Los niveles de glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato presentes en los glóbulos rojos ilustran este punto. Como hemos visto, estos productos se mantienen en las células en concentraciones de estado-estable alejadas de las condiciones de equilibrio pronosticadas por el valor de 0,5 de la K'_{eq}. De hecho, los niveles están tan lejos de las concentraciones de equilibrio, que la conversión de glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato ocurre continuamente en la célula, incluso cuando el estado de equilibrio tiene un $\Delta G°'$ positivo y de hecho favorece a la glucosa-6-fosfato. Esto se verifica en la mayoría de las reacciones y vías de la célula. Éstas se realizan y se aprovechan para realizar distintos tipos de trabajo celular ya que los reactivos, los productos y los metabolitos intermedios se mantienen en concentraciones de estado-estable alejadas del equilibrio termodinámico.

Este estado, a su vez, sólo es posible porque una célula es un sistema abierto que recibe grandes cantidades de energía de su entorno. Si la célula fuera un sistema cerrado, sus reacciones tenderían gradualmente hacia el equilibrio y la célula llegaría inexorablemente a un estado de mínima energía libre, que una vez alcanzado, no permitiría más cambios, no se realizaría trabajo y la vida cesaría. El estado estable tan necesario para la vida es posible solamente porque la célula es capaz de captar energía continuamente de su entorno, ya sea en forma de luz o de moléculas orgánicas de los alimentos. Esta captación continua de energía y el flujo de materia acompañante hacen posible el mantenimiento del estado estable en el que todos los reactivos y productos de la química celular se mantienen alejados del equilibrio para asegurar que el impulso termodinámico hacia el equilibrio sea aprovechado por la célula para realizar un trabajo útil, manteniendo y extendiendo de esa forma sus actividades y su complejidad estructural.

Nos centraremos en cómo se realiza todo esto en capítulos posteriores. En el siguiente capítulo veremos los principios de la catálisis enzimática que determinan las tasas de las reacciones celulares, es decir, se traduce el «puede realizarse» de la termodinámica por el «se realizará» de la cinética. Estaremos entonces preparados para pasar a los capítulos siguientes, donde encontraremos vías metabólicas funcionales como resultado de una serie de reacciones que actúan de manera conjunta.

Perspectiva

Los niveles de organización elevados que existen en las células son posibles gracias a la disponibilidad de energía en el entorno. Las células requieren energía para realizar varios tipos de cambios, incluyendo síntesis, movimiento, concentración, separación de cargas, generación de calor y bioluminiscencia. La energía que se necesita para esos procesos procede del sol o de los enlaces de las moléculas orgánicas oxidables como carbohidratos, grasas y proteínas. Puesto que los quimiótrofos se alimentan directa o indirectamente de los fotótrofos, hay un flujo unidireccional de energía a través de la biosfera, que tiene al sol como fuente inicial y a la entropía y a la pérdida de calor como destino eventual de toda la energía que se mueve a través de los sistemas vivos.

El flujo de energía que atraviesa las células se rige por las leyes de la termodinámica. La primera ley especifica que la energía puede cambiar de forma pero siempre se conserva. La segunda ley proporciona una medida de la espontaneidad termodinámica, aunque esto sólo significa que una reacción puede ocurrir y no dice nada sobre si realmente ocurrirá o en qué medida. Los procesos espontáneos van siempre acompañados por un *aumento* en la entropía del universo y por una *disminución* en la energía libre del sistema. Este último es un indicador de la espontaneidad mucho más práctico porque se puede calcular fácilmente a partir de la constante de equilibrio, las concentraciones en ese momento de reactivos y productos, y la temperatura.

Las células obtienen la energía que necesitan para realizar sus actividades manteniendo las concentraciones de los reactivos y los productos de distintas secuencias de reacciones en un estado-estable alejado del equilibrio, de esta manera permiten que las reacciones se desplacen exergónicamente hacia el equilibrio sin llegar a alcanzarlo.

Para que se realice una reacción es un prerrequisito necesario tener un D*G*´ negativo, pero esto no garantiza que la reacción se produzca a una velocidad razonable. Para calcularlo, debemos saber más sobre la reacción, no solamente su estado termodinámico. Necesitamos saber si hay catalizadores adecuados disponibles y a qué velocidad puede ocurrir la reacción en presencia del catalizador. En otras palabras, necesitamos las enzimas que encontraremos en el Capítulo 6.

Problemas

Los problemas de mayor dificultad están marcados con un •.

5.1 Energía solar. Aunque a veces oímos que existe preocupación sobre una crisis global de energía, en realidad vivimos en un planeta que está inundado por una inmensa cantidad de energía en forma de radiación solar. Cada día, cada año que llega y cada año que pasa, la energía solar alcanza la superficie más externa de la atmósfera terrestre a una tasa de 1,94 cal/min por centímetro cuadrado de superficie (*constante de energía solar*).

(a) Asumiendo que el área de una sección transversal de la Tierra es de alrededor de 1,28 $\times$ 10^{18} cm^2. ¿Cuál es la cantidad anual de energía entrante?

(b) Una porción considerable de esa energía, especialmente en los rangos de longitud de onda por debajo de 300 nm y por encima de 800 nm nunca alcanza la superficie de la Tierra ¿Puedes sugerir qué ocurre con ella?

(c) De la radiación que alcanza la superficie de la Tierra, sólo una pequeña proporción es realmente captada fotosintéticamente por los fotótrofos. (Puedes calcular el valor concreto en el Problema 5.2.) ¿Por qué crees que la eficiencia de su utilización es tan baja?

5.2 Transducción de energía fotosintética. La cantidad de energía captada y el volumen de carbono convertido en forma orgánica por transductores de energía fotosintética es asombrosa: alrededor de 5 $\times$ 10^{16} g de carbono al año sobre toda la superficie de la Tierra.

(a) Asumiendo que una molécula orgánica media en una célula tenga aproximadamente la misma proporción de carbono que la glucosa, ¿cuántos gramos de materia orgánica producen anualmente los fotótrofos fijadores de carbono?

(b) Asumiendo que toda la materia orgánica en el apartado a sea glucosa (o cualquier molécula con un contenido energético equivalente a la glucosa), ¿cuánta energía representa esa cantidad de materia orgánica? Asuma que la glucosa tiene un contenido de energía libre (energía libre de combustión) de 3,8 kcal/g.

(c) Con respecto a la respuesta del Problema 5.1a, ¿cuál es la eficiencia media con la que la energía radiante que incide sobre la atmósfera externa es captada fotosintéticamente sobre la superficie terrestre?

(d) ¿Qué proporción de la producción fototrófica neta anual de materia orgánica calculada en el apartado a, crees que es consumida por los quimiótrofos cada año?

5.3 Conversión energética. La mayoría de las actividades celulares implican la conversión de energía de una forma a otra. Para cada uno de los casos siguientes de un ejemplo biológico y explique el significado de la conversión

(a) Energía química en energía mecánica.

(b) Energía química en energía radiante.

(c) Energía solar (luminosa) en energía química.

(d) Energía química en energía eléctrica.

(e) Energía química en la energía potencial de un gradiente de concentración.

5.4 Entalpía, entropía y energía libre. La oxidación de la glucosa a dióxido de carbono y agua se representa por la siguiente reacción tanto si la oxidación ocurre por combustión en el laboratorio como si ocurre por oxidación biológica en las células vivas:

$$C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 \rightleftharpoons 6\ CO_2 + 6\ H_2O \qquad \textbf{(5.24)}$$

Cuando una combustión se realiza en el laboratorio en condiciones controladas, la reacción es altamente exotérmica, con una variación de entalpía (ΔH) de -673 kcal/mol. Como sabes por la Figura 5.10, ΔG para esta reacción a 25 °C es de -686 kcal/mol, por lo que la reacción es también altamente exergónica.

(a) Explique con sus propias palabras qué significan los valores ΔH y ΔG. ¿Qué significan los signos negativos en cada caso?

(b) ¿Qué significa decir que la diferencia entre los valores ΔG y ΔH se debe a la entropía?

(c) Sin hacer ningún cálculo, ¿esperaría que ΔS (variación de la entropía) fuera positivo o negativo? Explique su respuesta.

(d) Ahora calcule ΔS para esta reacción a 25 °C. ¿Coincide el signo del valor calculado con su predicción del apartado c?

(e) ¿Cuáles son los valores de ΔG, ΔH e ΔS para la reacción contraria a la de arriba, tal como es llevada a cabo por una célula de un alga fotosintética que usa CO_2 y H_2O para sintetizar $C_6H_{12}O_6$?

5.5 La constante de equilibrio. La siguiente reacción es uno de los pasos de la vía glicolítica que encontraremos de nuevo en el Capítulo 9. Sin embargo, ya debe reconocerla, porque la hemos usado antes como ejemplo (Reacción 5.6):

$$\text{Glucosa-6-fosfato} \rightleftharpoons \text{fructosa-6-fosfato} \qquad \textbf{(5.25)}$$

La constante de equilibrio K_{eq} para esta reacción a 25 °C es 0,5.

(a) Asuma que incuba una solución que contiene glucosa-6-fosfato (G6P) 0,15 *M* toda la noche a 25 °C con la enzima fosfoglucomutasa que cataliza la Reacción 5.25. ¿Cuántos milimoles de fructosa-6-fosfato (F6P) recuperará de 10 mL de la mezcla de incubación la mañana siguiente, asumiendo que dispone del procedimiento cromatográfico apropiado para separar F6P de G6P?

(b) ¿Qué respuesta obtendría para el apartado a, si por el contrario, hubiera comenzado con una solución que contuviera F6P 0,15 *M*?

(c) ¿Qué respuesta esperaría para el apartado a si hubiera empezado con una solución que contuviera G6P 0,15*M* pero hubiera olvidado añadir fosfoglucomutasa a la mezcla de incubación?

(d) ¿Podría haber respondido a la pregunta del apartado a si hubiera utilizado 15 °C como temperatura de incubación en vez de 25 °C? ¿Por qué o por qué no?

5.6 Cálculo de $\Delta G°'$ e $\Delta G'$. Como en la Reacción 5.25, la conversión de 3-fosfoglicerato (3PG) en 2-fosfoglicerato (2PG) es una reacción celular importante ya que es uno de los pasos de la vía glicolítica (*véase* Capítulo 9):

$$\text{3-fosfoglicerato} \rightleftharpoons \text{2-fosfoglicerato} \qquad \textbf{(5.26)}$$

Si la enzima que cataliza esta reacción se añade a una solución de 3PG a 25 °C y pH 7,0, la constante de equilibrio entre las dos especies será de 0,165

$$K'_{eq} = \frac{[\text{2-fosfoglicerato}]_{eq}}{[\text{3-fosfoglicerato}]_{eq}} = 0{,}165 \qquad \textbf{(5.27)}$$

En los glóbulos rojos humanos, los valores experimentales para las concentraciones en el estado estable de estos compuestos es de 61 μM para 3PG y de 4,3 μM para 2PG.

(a) Calcule $\Delta G^{\circ\prime}$. Explique con sus propias palabras qué significa este valor.

(b) Calcule $\Delta G'$. Explique con sus propias palabras qué significa este valor. ¿Por qué $\Delta G'$ e $\Delta G^{\circ\prime}$ son diferentes?

(c) Si las condiciones en la célula cambian de tal forma que la concentración de 3PG se mantiene fija a 61 μM pero la concentración de 2PG comienza a aumentar, a cuánto tendría que aumentar la concentración de 2PG antes de que la Reacción 5.26 cesara porque ya no fuera factible termodinámicamente?

5.7 ¿Hacia atrás o hacia delante?. La interconversión de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) en gliceraldehído 3 fosfato (G3P) forma parte tanto de la vía glicolítica (*véase* Capítulo 9) como del ciclo de Calvin para la fijación de carbono en la fotosíntesis (*véase* Capítulo 11):

$$\underset{\text{DHAP}}{\text{Dihidroxiacetona fosfato}} \rightleftharpoons \underset{\text{G3P}}{\text{gliceraldehído-3-fosfato}} \qquad \textbf{(5.28)}$$

El valor de $\Delta G^{\circ\prime}$ para esta reacción es de $+1{,}8$ kcal/mol a 25 °C. En la vía glicolítica esta reacción va hacia la *derecha*, convirtiendo DHAP en G3P. En el ciclo de Calvin, estas reacciones se producen hacia la *izquierda*, convirtiendo G3P en DHAP.

(a) ¿Hacia qué lado se encontrará el equilibrio? ¿Cuál es la constante de equilibrio a 25 °C?

(b) En condiciones estándar, ¿en qué dirección tiende a producirse esta reacción? ¿Cuál es el valor de $\Delta G'$ para la reacción *en esa dirección*?

(c) En la vía glicolítica, esta reacción se produce hacia la derecha porque el G3P se consume por la reacción siguiente de la vía, por eso el G3P se mantiene a concentración baja. ¿Cuál será el valor de $\Delta G'$ (a 25 °C) si la concentración de G3P se mantuviera al 1% de la concentración de DHAP (es decir, si $[\text{G3P}]/[\text{DHAP}] = 0{,}01$)?

(d) En el ciclo de Calvin, esta reacción se produce hacia la izquierda. ¿A cuánto debe ascender la relación [G3P]/[DHAP] para asegurarse de que la reacción sea exergónica en al menos –3 kcal/mol (a 25 °C)?

5.8 Oxidación de succinato. La oxidación de succinato a fumarato es una reacción celular importante debido a que es uno de los pasos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) (*véase* Capítulo 10). Los dos átomos de hidrógeno que se separan del succinato son aceptados por una molécula de coenzima denominada flavin adenin dinucleótido (FAD), que se reduce entonces a $FADH_2$:

Succinato + FAD ⇌ Fumarato + $FADH_2$ **(5.29)**

El valor de $\Delta G^{\circ\prime}$ para esta reacción es de 0 cal/mol.

(a) Si se empieza con una solución que contiene 0,01M de succinato y FAD y se añade la cantidad apropiada de la enzima que cataliza esta reacción, ¿se formará algo de fumarato? Si lo hace, calcule las concentraciones que resultarán para las cuatro especies en el equilibrio. Si no, explique por qué no.

(b) Conteste al apartado a asumiendo que también $FADH_2$ está presente desde el inicio a una concentración de 0,01 M.

(c) Asumiendo que las condiciones del estado de estabilidad de una célula son tales que la proporción entre $FADH_2/FAD = 5$ y que la concentración de fumarato es de 2,5 μM, ¿qué concentración de succinato será necesaria en el estado estable para mantener $\Delta G'$ para la oxidación del succinato en –1,5 kcal/mol?

5.9 Plegamiento de proteínas. En el Capítulo 2, aprendimos que un polipéptido en solución normalmente se pliega en su estructura tridimensional más apropiada de forma espontánea. La fuerza que impulsa este plegamiento es la tendencia a alcanzar la conformación que desde el punto de vista termodinámico sea más favorable. Un polipéptido plegado puede ser inducido a desplegarse (es decir a sufrir la desnaturalización) si la solución se calienta, se acidifica o se alcaliniza. El polipéptido desnaturalizado es una estructura aleatoria, con muchas conformaciones posibles.

(a) ¿Cuál es el signo de ΔG para el proceso de plegamiento? ¿Y con respecto del proceso de despliegue (desnaturalización)? ¿Cómo lo sabes?

(b) ¿Cuál es el signo de ΔS para el proceso de plegamiento? ¿Y con respecto al desplegamiento (desnaturalización)? ¿Cómo lo sabe?

(c) La contribución de ΔS a la variación de energía libre, ¿será positiva o negativa?

(d) ¿Cuáles son los principales tipos de enlaces e interacciones que deben romperse o destruirse si el polipéptido plegado tiene que desplegarse? ¿Por qué el calor o los pH extremos provocan el despliegue?

5.10 Transporte de membrana. Como aprenderemos en el Capítulo 8, se puede tratar el transporte a través de membrana como una reacción química y calcular el ΔG de la misma forma en que lo haríamos para cualquier otra reacción. La «reacción» general para el transporte de una molécula X desde el exterior de la célula hacia el interior se puede representar como:

$$X_{\text{exterior}} \rightarrow X_{\text{interior}} \qquad \textbf{(5.30)}$$

Con lo que la variación de la energía libre se escribe como:

$$\Delta G_{\text{entrada}} = \Delta G^{\circ} + \text{RT} \ln [X]_{\text{interior}}/[X]_{\text{exterior}} \qquad \textbf{(5.31)}$$

Sin embargo, la K_{eq} para el transporte de un soluto no cargado a través de la membrana es siempre 1, de manera que ΔG° es siempre 0 y la ecuación para ΔG se simplifica en consecuencia.

(a) ¿Por qué para el transporte de moléculas a través de la membrana la K_{eq} es siempre 1? ¿Por qué el ΔG° es siempre 0?

(b) ¿Cuál es la ecuación simplificada para el $\Delta G_{\text{entrada}}$? ¿Y para ΔG_{salida}?

(c) Suponga que la concentración de lactosa en una célula bacteriana se mantiene a 10 mM, mientras que la

concentración de lactosa en el exterior es de solamente 0,2 mM. ¿Podría predecir si $\Delta G_{entrada}$ para lactosa sería positivo o negativo? Explique su razonamiento.

(d) Calcule el $\Delta G_{entrada}$ para lactosa asumiendo una temperatura de 25 °C. ¿Se corresponde el signo con su predicción para el apartado c?

(e) Una de las diferentes fuentes de energía que conducen a la captación de lactosa en estas condiciones es la hidrólisis de ATP, que tiene un valor de −7,3 kcal/mol para $\Delta G^{\circ\prime}$. ¿Será suficiente la hidrólisis de una única molécula de ATP para impulsar el transporte de una molécula de lactosa hacia el interior en estas condiciones?

•**5.11 Prueba de aditividad.** Una propiedad útil de los parámetros termodinámicos como $\Delta G'$ o ΔG° es que son aditivos para las reacciones secuenciales. Asumiendo que K'_{AB}, K'_{BC}, K'_{CD}, son las constantes de equilibrio para sus respectivas reacciones en la siguiente secuencia:

$$A \underset{\text{Reacción 1}}{\rightleftharpoons} B \underset{\text{Reacción 2}}{\rightleftharpoons} C \underset{\text{Reacción 3}}{\rightleftharpoons} D \quad \textbf{(5.32)}$$

(a) Pruebe que la constante de equilibrio K'_{AD} para la conversión total de A en D es el *producto* de las constantes de equilibrio de los tres componentes:

$$K'_{AD} = K'_{AB}K'_{BC}K'_{CD} \quad \textbf{(5.33)}$$

(b) Pruebe que $\Delta G^{\circ\prime}$ para la conversión total de A en D es la *suma* de los valores de $\Delta G^{\circ\prime}$ de los tres componentes:

$$\Delta G^{\circ\prime}_{AD} = \Delta G^{\circ}_{AB} + \Delta G^{\circ\prime}_{BC} + \Delta G^{\circ\prime}_{CD} \quad \textbf{(5.34)}$$

(c) Pruebe que los valores de $\Delta G'$ son igualmente aditivos

•**5.12 Utilizando la aditividad**. La aditividad de los parámetros termodinámicos vistos en el Problema 5.1 no sólo se aplica a las reacciones secuenciales de una vía, sino en *cualquier* reacción o proceso. Además, también se aplica la sustracción de reacciones. Use esta información para contestar las siguientes cuestiones:

(a) La fosforilación de glucosa utilizando fosfato inorgánico (Pi de forma abreviada) es endergónica ($\Delta G^{\circ\prime} = +3,3$ kcal/mol), mientras que la defosforilación (hidrólisis) de ATP es exergónica ($\Delta G^{\circ\prime} = -7,3$ kcal/mol):

$$\text{glucosa} + \text{Pi} \rightleftharpoons \text{glucosa-6-fosfato} + H_2O \quad \textbf{(5.35)}$$

$$\text{ATP} + H_2O \rightleftharpoons \text{ADP} + P_i \quad \textbf{(5.36)}$$

Escriba una reacción para la fosforilación de la glucosa por transferencia de un grupo fosfato procedente del ATP, y calcule $\Delta G^{\circ\prime}$ para la reacción.

(b) Sus células musculares utilizan la fosfocreatina para almacenar energía. La defosforilación de la fosfocreatina, como la del ATP (Reacción 5.37) es una reacción altamente exergónica con $\Delta G^{\circ\prime} = -10,3$ kcal/mol:

$$\text{fosfocreatina} + H_2O \rightleftharpoons \text{creatina} + P_i \quad \textbf{(5.37)}$$

Escriba una reacción para la transferencia de fosfato desde fosfocreatina a ADP para generar creatina y ATP, y calcule $\Delta G^{\circ\prime}$ para la reacción.

Bibliografía recomendada

Las referencias con importancia histórica están marcadas con •.

Referencias generales

Demirel, Y. y S. I. Sandler. Thermodynamics and bioenergetics. *Biophys. Chem.* 97 (2002): 87.

Di Cera, E. *Thermodynamics in Biology*. New York: Oxford University Press, 2000.

Lehninger, A. L., D. L. Nelson y M. M. Cox. *Principles of Biochemistry*, 3rd ed. New York:Worth, 1999.

Mathews, C. K., K. E. van Holde y K G. Ahern. *Biochemistry*, 3rd ed. San Francisco: Benjamin/Cummings, 2000.

Murray, R. K. *Harper's Illustrated Biochemistry*, 26th ed. New York: McGraw Hill, 2003.

Referencias históricas

•Blum, H. F. *Time's Arrow and Evolution*, 3rd. ed. Princeton, NJ: Princeton University Press, 1968.

•Gates, D. M. The flow of energy in the biosphere. *Sci. Amer.* 224 (September 1971): 88.

•Racker, E. From Pasteur to Mitchell: A hundred years of bioenergetics. *Fed. Proc.* 39 (1980): 210.

Bioenergética

Brown, G. C. *The Energy of Life: The Science of What Makes Our Minds and Bodies Work*. New York: Free Press, 2000.

Cooper, A. Thermodynamic analysis of biomolecular interactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3 (1999): 557.

Demetrius, L. Thermodynamics and evolution. *J. Theor. Biol.* 206 (2000): 1.

Dzeja, P. P. y A. Terzic. Phosphotransfer networks and cellular energetics. *J. Exp. Biol.* 206 (2003): 2039.

Harris, D. A. *Bioenergetics at a Glance*. London: Blackwell Press, 1995.

Haynie, D. T. *Biological Thermodynamics*. Cambridge: Cambridge University Press, 2001.

Papa, S., F. Guerrieri y J. M. Tager. *Frontiers of Cellular Bioenergetics: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiopathology*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999.

Peschek, G. A.,W. Löffelhardt y G. Schmetterer, eds. *Phototrophic Prokaryotes*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999.

Rees, D. C. y J. B. Howard. Structural bioenergetics and energy transduction mechanisms. *J.Molec.Med.* 293 (1999): 343.

Schafer, G., M. Engelhard y V.Muller. Bioenergetics of the Archaea. *Microbiol.Mol. Biol. Rev.* 63 (1999): 570.

6

Enzimas: los catalizadores de la vida

En el Capítulo 5 hicimos referencia a $\Delta G'$, la variación de energía libre, y vimos su importancia como indicador de la espontaneidad termodinámica. Concretamente, el *signo* de $\Delta G'$ nos dice si una reacción es posible en la dirección indicada, y la *magnitud* de $\Delta G'$ indica la cantidad de energía que puede ser liberada (o que debe ser suministrada), mientras que la reacción tiene lugar en esa dirección, bajo las condiciones para las cuales se calculó $\Delta G'$. Al mismo tiempo, pusimos cuidado en señalar que el parámetro termodinámico $\Delta G'$ no puede proporcionarnos ninguna pista en cuanto a si una reacción factible tendrá lugar realmente, y a qué velocidad. En otras palabras, $\Delta G'$ nos dice si una reacción *puede* tener lugar pero no dice nada en absoluto sobre si realmente *tendrá* lugar. Para esta distinción, necesitamos conocer, no sólo la dirección y la energía de la reacción, sino también algo acerca del mecanismo y la velocidad.

Esto nos lleva al tema de la **catálisis enzimática,** porque prácticamente todas las reacciones o procesos celulares son mediados por proteínas (o, en ciertos casos, ARN) catalizadoras llamadas *enzimas.* Las únicas reacciones que ocurren a una velocidad apreciable en una célula son aquellas para las cuales las enzimas apropiadas están presentes y activas. Así, las enzimas casi siempre significan la diferencia entre «puede tener lugar» y «tendrá lugar» en las reacciones celulares. Sólo cuando exploramos la naturaleza de las enzimas y sus propiedades catalizadoras, comenzamos a entender por qué las reacciones que son factibles energéticamente, tienen lugar realmente en las células y cómo se controla la velocidad de tales reacciones.

En este capítulo, consideraremos primero por qué las reacciones termodinámicamente espontáneas no tienen lugar normalmente a velocidades apreciables sin un catalizador, y después veremos el papel de las *enzimas* como catalizadores biológicos específicos. También veremos cómo la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente se ve afectada por la concentración del sustrato disponible para la reacción. Asimismo, se analizarán algunas de las formas de regulación de la tasa de reacciones encaminadas a satisfacer las necesidades de la célula.

Energía de activación y el estado metaestable

Si se detiene a pensarlo, usted ya está familiarizado con muchas reacciones que son termodinámicamente factibles, aunque no ocurran muy a menudo. Un ejemplo evidente, considerado en el Capítulo 5, es la oxidación de la glucosa (*véase* Reacción 5.9). Esta reacción (realmente, serie de reacciones) es altamente exergónica ($\Delta G' = -686$ kcal/mol) y, sin embargo, no ocurre por sí misma. De hecho, la glucosa en forma cristalina o en solución, se puede exponer al oxígeno del aire indefinidamente, y la oxidación será mínima o incluso inexistente. La celulosa del papel sobre el cual están impresas estas palabras, es otro ejemplo, como lo es *usted* mismo, que está formado por un conjunto complejo de moléculas termodinámicamente inestables.

No tan cercanas, pero igualmente importantes para la química celular, son muchas reacciones termodinámicamente factibles, pero que no tienen lugar por sí mismas a una velocidad apreciable. Como ejemplo, consideremos a la molécula de alta energía adenosina trifosfato (ATP), la cual tiene una $\Delta G'$ altamente favorable ($-7{,}3$ kcal/mol) para la hidrólisis de su grupo fosfato terminal, durante la

formación del correspondiente difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (P_i):

$$ATP + H_2O \rightleftharpoons ADP + P_i \qquad (6.1)$$

Esta reacción es muy exergónica bajo condiciones estándar e incluso lo es más en las condiciones que prevalecen en las células. Sin embargo, a pesar de que la variación de energía libre es muy alta, esta reacción tiene lugar por sí misma sólo lentamente, de manera que el ATP permanece estable durante varios días cuando se disuelve en agua pura. Esta propiedad parece ser compartida por muchas moléculas y reacciones biológicas.

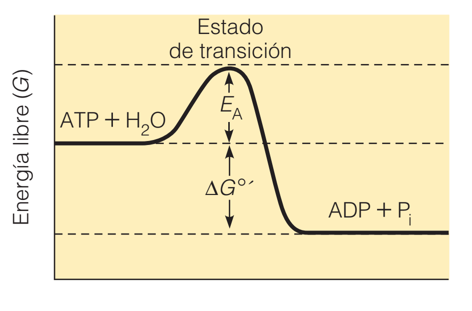
La barrera de activación energética debe ser superada antes de que se pueda verificar una reacción química

Las moléculas que deberían reaccionar entre sí, a menudo no lo hacen porque carecen de energía suficiente. Para toda reacción, hay una energía de **activación específica** (**E_A**), definida como la cantidad mínima de energía que los reactivos deben tener antes de que la colisión entre ellos tenga éxito, dando origen a los productos. Más específicamente, los reactivos necesitan alcanzar un estado químico intermedio llamado **estado de transición,** cuya energía libre es mayor que la de los reactivos iniciales. La Figura 6.1a muestra la energía de activación requerida para que las moléculas de ATP y H_2O alcancen el estado de transición. $\Delta G^{o\prime}$ mide la diferencia en la energía libre entre los reactivos y los productos (−7,3 kcal/mol para esta reacción en particular), mientras E_A indica el mínimo de energía requerida para que los reactivos alcancen el estado de transición y, por tanto, sean capaces de dar lugar a los productos.

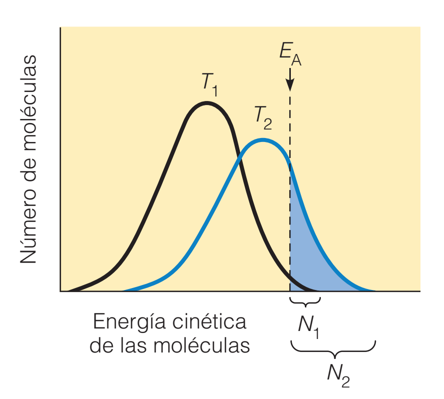
La velocidad real de una reacción es siempre proporcional a la fracción de moléculas que tienen una energía igual o mayor que E_A. Cuando en una solución a temperatura ambiente, las moléculas de ATP y agua se mueven libremente, cada una posee una cierta cantidad de energía en un momento dado. Como se muestra en la Figura 6.1b, la distribución de energía entre las moléculas tiene forma de campana; algunas moléculas tendrán poca energía, algunas podrán tener mucha, y la mayoría estará cerca del promedio. El hecho a destacar es que sólo las moléculas capaces de reaccionar en un instante dado, son las que tienen suficiente energía para superar la barrera de energía de activación (Figura 6.1b, línea discontinua).

El estado metaestable es el resultado de la barrera de activación

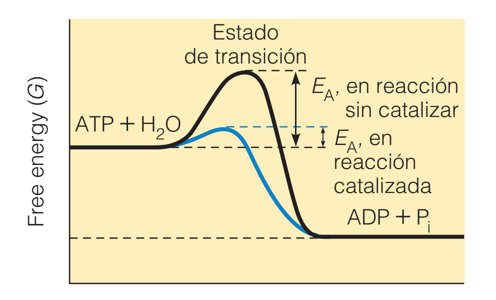
La energía de activación es, para la mayoría de las reacciones biológicas a temperaturas celulares normales, lo sufi-



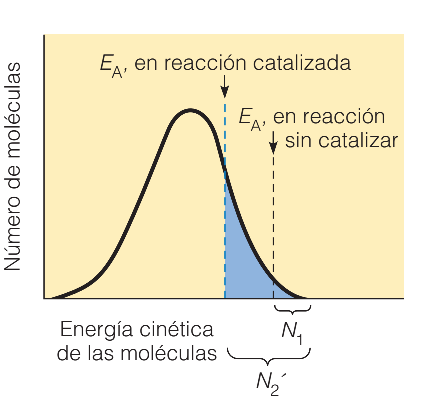
(a) Secuencia de reacción



(b) Activación termal



(c) Secuencia de reacción con catalizador



(d) Activación catalítica

Figura 6.1 Efecto de la catálisis en la energía de activación y en el número de moléculas capaces de reaccionar. (**a**) La energía de activación E_A es la cantidad mínima de energía cinética que deben poseer los reactivos (aquí, ATP y H_2O) para permitir las colisiones que conducen a la formación del producto. Cuando los reactivos rebasan la barrera de energía de activación y reaccionan, los productos tienen una energía libre reducida en una cantidad $\Delta G^{o\prime}$. (**b**) El número de moléculas N_1, que son lo suficientemente energéticas para sobrepasar la barrera de energía de activación y chocar satisfactoriamente, se puede incrementar a N_2, elevando la temperatura de T_1 a T_2. (**c**) La energía de activación también puede disminuirse por un catalizador, (**d**) incrementándose así el número de moléculas de N_1 a N_2', sin que cambie la temperatura.

cientemente alta para que la proporción de moléculas que posean mucha energía en un instante dado, sea extremadamente pequeña. Por consiguiente, la velocidad de las reacciones no catalizadas en las células es muy baja, y la mayoría de las moléculas parecen ser estables, pese a ser reactivos potenciales en reacciones favorecidas termodinámicamente. Son, en otras palabras, termodinámicamente inestables, pero no tienen la energía suficiente para sobrepasar la barrera de la energía de activación.

Tales moléculas, aparentemente estables, se dice que están en un estado metaestable. Para las células y los biólogicos celulares, la energía de activación alta y el estado metaestable de los constituyentes celulares, son cruciales, porque la vida, por su propia naturaleza, es un sistema mantenido en un estado estacionario lejos del equilibrio. Si no fuera por el estado metaestable, todas las reacciones tenderían rápidamente al equilibrio y la vida sería imposible tal como la conocemos. La vida, por lo tanto, depende de que las energías de activación sean altas, evitando que la mayoría de las reacciones celulares ocurran a velocidades apreciables en ausencia de un catalizador apropiado.

Los catalizadores superan la barrera de la energía de activación

La energía de activación no es sólo importante para el mantenimiento del estado metaestable, sino que es también una barrera que se debe superar, para que las reacciones deseables tengan lugar a velocidades adecuadas. Dado que el contenido energético de una molécula dada debe superar E_A antes de que la molécula sea capaz de reaccionar, la única manera de que pueda verificarse una reacción basada en reactivos metaestables, a una velocidad adecuada, es aumentar la proporción de moléculas suficientemente energéticas. Esto se puede conseguir, bien aumentando el contenido medio de energía de todas las moléculas, o bien reduciendo el requerimiento de energía de activación.

Una manera de incrementar el contenido de energía del sistema es suministrando calor. Como muestra la Figura 6.1b, simplemente incrementando la temperatura del sistema desde T_1 a T_2 se aumentará la energía cinética de las moléculas, asegurando, por tanto, que haya un mayor número de moléculas reactivas (N_2 en lugar de N_1). Así, la hidrólisis de ATP podría ser facilitada calentando la solución, es decir, confiriendo a cada molécula de ATP y agua más energía. El problema de usar una temperatura elevada es que es incompatible con la vida, porque los sistemas biológicos requieren una temperatura relativamente constante. Las células son esencialmente sistemas isotérmicos (temperatura constante) y requieren métodos isotérmicos para resolver el problema de la activación.

La alternativa a un incremento de la temperatura es reducir el requerimiento de la energía de activación. De ese modo, nos aseguramos de que una proporción mayor de moléculas tenga la suficiente energía para colisionar con éxito y experimentar una reacción. Si los reactivos pueden agruparse sobre algún tipo de superficie que facilite que las porciones potencialmente reactivas de las moléculas adyacentes se yuxtapongan apropiadamente, la interacción se verá favorecida enormemente y la energía de activación reducida de manera eficaz.

La tarea de proveer de tal superficie reactiva es la propia de un **catalizador**, agente que aumenta la velocidad de una reacción, disminuyendo la energía de activación (Figura 6.1c) y asegurando que una proporción mayor de moléculas sean suficientemente energéticas para experimentar la reacción sin suministro de calor (Figura 6.1d). Una característica primordial de un catalizador es que no se modifica permanentemente, ni se consume, mientras la reacción tiene lugar. Simplemente proporciona un ambiente adecuado para facilitar la reacción.

Podemos considerar la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, como un ejemplo de catálisis:

$$2\,H_2O_2 \rightleftharpoons 2\,H_2O + O_2 \qquad \textbf{(6.2)}$$

Ésta es una reacción termodinámicamente favorecida, pese a que el peróxido de hidrógeno exista en un estado metaestable debido a la alta energía de activación de la reacción. Sin embargo, si añadimos un número pequeño de iones de hierro (Fe^{3+}) a una solución de peróxido de hidrógeno, la reacción de descomposición tiene lugar unas 30.000 veces más rápida que sin los iones de hierro. Claramente, el ion Fe^{3+} es el catalizador en esta reacción, reduciendo la energía de activación (como se muestra en la Figura 6.1c) y, por tanto, asegurando que una proporción significativamente mayor de moléculas de peróxido de hidrógeno (30.000 veces más) posean la energía adecuada para descomponerse a la temperatura dada, sin necesidad de aporte energético adicional.

En las células, la solución para la descomposición del peróxido de hidrógeno no es la adición de iones férricos, sino la enzima *catalasa*, una proteína que contiene hierro. En presencia de la catalasa la reacción es 100.000.000 de veces más rápida que en ausencia de catalizador. La catalasa contiene átomos de hierro retenidos en estructuras químicas llamadas *porfirinas*. Así, la ventaja de la catálisis inorgánica se incorpora dentro del contexto de una molécula proteica. Esta combinación da lugar a un catalizador mucho más eficaz para la descomposición del peróxido de hidrógeno que los iones de hierro aislados. El incremento de la velocidad de, aproximadamente, 10^8 veces para la catalasa, no es un valor atípico en absoluto; los aumentos de velocidad de las reacciones catalizadas enzimáticamente están en el rango comprendido entre 10^7 y 10^{14}, en comparación con las reacciones no catalizadas. Estos valores subrayan la importancia extraordinaria de las enzimas como catalizadores y nos llevan hasta el tema principal de este capítulo.

Enzimas como catalizadores biológicos

Independientemente de su naturaleza química, todos los catalizadores comparten tres propiedades básicas:

1. Un catalizador incrementa la velocidad de una reacción disminuyendo el requerimiento de la energía de activación y permitiendo que una reacción termodinámicamente factible, tenga lugar a una velocidad razonable, sin necesidad de activación térmica.
2. Un catalizador funciona formando complejos transitorios con las moléculas de sustrato, ligándolas de manera que se facilite su interacción.
3. Un catalizador cambia sólo la *velocidad* a la que se consigue el equilibrio; no tiene efecto sobre la *posición* del equilibrio. Es decir, un catalizador puede incrementar la velocidad de las reacciones exergónicas, pero no puede, de ninguna manera, servir como motor energético de una reacción endergónica. En otras palabras, los catalizadores no son genios termodinámicos.

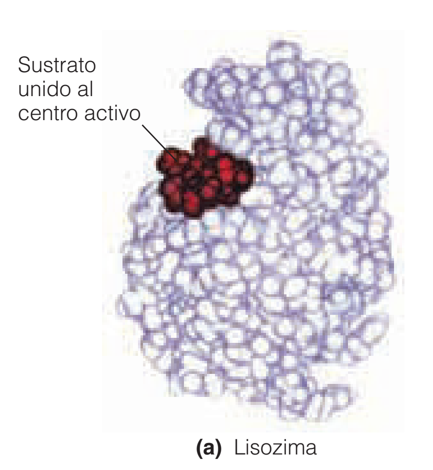
Estas propiedades son comunes a todos los catalizadores, sean orgánicos o inorgánicos. Refiriéndonos a nuestro ejemplo, esto se aplica igualmente a los iones de hierro y a las moléculas de catalasa. Sin embargo, los sistemas biológicos raramente usan catalizadores inorgánicos. En vez de eso, fundamentalmente todas las catálisis en las células se llevan a cabo por moléculas orgánicas (proteínas en la mayoría de los casos) llamadas enzimas. Debido a que las enzimas son moléculas orgánicas, son mucho más específicas que los catalizadores inorgánicos, y sus actividades se pueden regular con mucho más cuidado.

La mayoría de las enzimas son proteínas

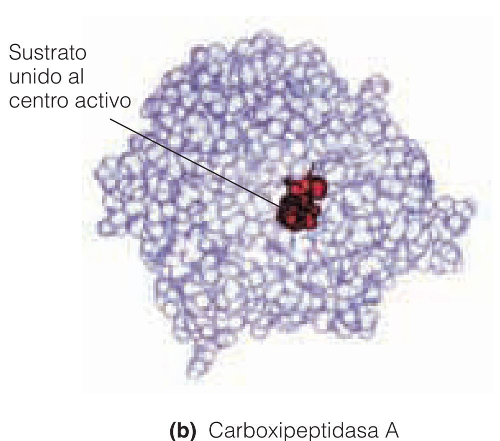
La capacidad de los extractos celulares para catalizar reacciones químicas se ha conocido desde los estudios de la fermentación de Eduard y Hans Buchner en 1897. De hecho, uno de los primeros nombres aplicados a lo que ahora llamamos enzimas fue el de *fermentos.* Sin embargo, hubo que esperar hasta 1926 para obtener la primera enzima cristalizada, la *ureasa* (a partir de las alubias, por James B. Sumner), demostrándose que era una proteína. Incluso, entonces, pasó un tiempo hasta que los bioquímicos y enzimólogos apreciaran que los «fermentos» que estaban estudiando eran, de hecho, proteínas catalíticas, y que para su completa comprensión se requería entender su estructura y función como proteínas. (En los primeros años de 1980, los biólogos descubrieron que, además de las proteínas, ciertas moléculas de ARN, llamadas *ribozimas*, tienen también actividad catalítica. Las ribozimas serán discutidas en una sección próxima. Aquí, consideraremos las enzimas como proteínas, las cuales son, realmente, la mayoría.)

El sitio activo. Uno de los conceptos más importantes para entender las enzimas como proteínas, es el de **sitio activo**. Cada enzima, independientemente de la reacción que catalice o de su estructura particular, contiene dentro de alguna parte de su estructura terciaria un grupo característico de aminoácidos que forman el sitio activo, donde ocurre el evento catalítico del cual esa enzima es responsable. Normalmente, el sitio activo es un surco o bolsillo real con propiedades químicas y estructurales que permiten la acomodación adecuada y específica del sustrato. La Figura 6.2 muestra los modelos obtenidos por ordenador de las enzimas *lisozima* y *carboxipeptidasa A*, que ilustran bien el ajuste preciso de la molécula de sustrato en los bolsillos producidos por el pliegue característico de las cadenas de polipéptidos. La lisozima es una enzima que rompe las uniones glicosídicas en los peptidoglicanos de las paredes bacterianas, conduciendo a la lisis (ruptura) y muerte de las bacterias. La carboxipeptidasa A es una enzima que modifica los polipéptidos eliminando un aminoácido cada vez desde el extremo C-terminal del polipéptido.

El sitio activo de una enzima típica comprende un número determinado de aminoácidos, que normalmente no son contiguos, a lo largo de la secuencia primaria de la proteína. En todo caso, se mantienen juntos, en una conformación correcta, gracias al plegamiento tridimensional ca-



(a) Lisozima



(b) Carboxipeptidasa A

Figura 6.2 Estructuras moleculares de la lisozima y la carboxipeptidasa A. Modelo tridimensional compacto generado por ordenador de las enzimas (**a**) lisozima y (**b**) carboxipeptidasa A, con las respectivas moléculas de sustrato unidas a sus sitios activos, un segmento corto de un peptidoglicano bacteriano, en el caso de la lisozima y un péptido artificial, en el caso de la carboxipeptidasa A.

racterístico de la cadena polipeptídica. Por ejemplo, la molécula carboxipeptidasa A, que se muestra en la Figura 6.2b, consiste en un único polipéptido de 307 residuos amoinoacílicos, de los que sólo seis están presentes en el sitio activo: los residuos de histidina en las posiciones 69 y 196, los de glutamato en las posiciones 72 y 270, el de arginina en la posición 145, y el de tirosina en la posición 248. Esta relación de aminoácidos situados a lo largo de la cadena, subraya la importancia de la estructura terciaria total de la molécula enzimática. Sólo cuando la molécula alcanza su conformación tridimensional estable se reúnen los aminoácidos específicos para constituir el sitio activo.

En realidad sólo unos pocos de los 20 aminoácidos diferentes que forman las proteínas, están presentes en el sitio activo de la mayoría de las proteínas que han sido estudiadas. Casi siempre aparecen los aminoácidos cisteína, histidina, serina, aspartato, glutamato y lisina. Todos ellos pueden participar en la unión del sustrato al sitio activo durante el proceso catalítico, y la histidina, el aspartato, y el glutamato, sirven también como donantes o aceptores de protones.

Algunas enzimas, además de estar formadas por una o más cadenas polipeptídicas, pueden portar también componentes no proteicos. Estos componentes, llamados **grupos prostéticos,** normalmente son moléculas orgánicas pequeñas o iones metálicos, tales como el hierro de la enzima catalasa. Frecuentemente, funcionan como aceptores de electrones, porque ninguno de los aminoácidos laterales de la cadena es un buen aceptor de electrones. Los grupos prostéticos, en los casos en que están presentes, se localizan en el sitio activo y son indispensables para la actividad catalítica de la enzima. La carboxipeptidasa A es un ejemplo de una enzima con un grupo prostético; tiene un átomo de zinc estrechamente unido a dos residuos de histidina y a uno de los glutamatos, en su sitio activo.

Especificidad enzimática. Una consecuencia de la estructura del sitio activo es que las enzimas manifiestan un alto grado de **especificidad por el sustrato**, puesto de manifiesto por su habilidad para discriminar entre moléculas muy similares. La especificidad es una de las propiedades más características de los seres vivos, y precisamente las enzimas son unos de los ejemplos más espectaculares de especificidad biológica.

Podemos mostrar esta especificidad comparando las enzimas con los catalizadores inorgánicos. La mayoría de los catalizadores inorgánicos son muy pocos específicos y por ello pueden actuar sobre una variedad de componentes que comparten alguna característica química general.

Considere, por ejemplo, la *hidrogenación* (incorporación de hidrógeno a un enlace insaturado C═C):

$$\mathrm{R{-}\overset{H}{\underset{}{C}}{=}\overset{H}{C}{-}R'} + \mathrm{H_2} \xrightarrow[\text{Pt o Ni}]{} \mathrm{R{-}\overset{H}{\underset{H}{C}}{-}\overset{H}{\underset{H}{C}}{-}R'} \qquad \textbf{(6.3)}$$

Esta reacción se puede llevar a cabo en el laboratorio usando un catalizador de platino (Pt) o de níquel (Ni), como se indica. Estos catalizadores inorgánicos son muy poco específicos, pudiendo catalizar la hidrogenación de una amplia variedad de componentes insaturados. De hecho, el níquel o el platino se usan comercialmente para hidrogenar aceites vegetales poliinsaturados, en la fabricación de manteca para guisar o de manteca vegetal. Se pueden hidrogenar eficazmente en presencia de níquel o platino, con independencia de cuál sea la estructura del componente insaturado.

Comparémoslo con el ejemplo biológico de la hidrogenación que tiene lugar en la conversión de fumarato en succinato, reacción que consideraremos de nuevo en el Capítulo 10:

$$\underset{\text{Fumarato}}{\mathrm{^-OOC{-}CH{=}CH{-}COO^-}} + 2\mathrm{H^+} + 2e^- \rightleftharpoons \underset{\text{Succinato}}{\mathrm{^-OOC{-}CH_2{-}CH_2{-}COO^-}} \qquad \textbf{(6.4)}$$

Esta reacción es catalizada en las células por la enzima *succinato deshidrogenasa* (llamada así porque normalmente funciona en el metabolismo energético en la dirección opuesta). Esta deshidrogenasa, como muchas enzimas, es altamente específica. No puede añadir o quitar hidrógenos desde ningún compuesto, excepto los que se muestran en la Reacción 6.4. De hecho, esta enzima es tan específica que incluso no puede reconocer al maleato, una isoforma del fumarato (Figura 6.3).

No todas las enzimas son tan específicas; algunas reconocen un número muy concreto de substratos, y otras reconocen una categoría amplia de sustancias, siempre que posean características estructurales comunes. Esta **especificidad por grupos** es más frecuente en enzimas implicadas en la síntesis y degradación de polímeros. El objetivo de la carboxipeptidasa A es degradar los enlaces polipeptídicos desde el grupo carboxilo terminal; así, la función de

Figura 6.3 Los estereoisómeros (a) fumarato y (b) maleato.

esta enzima es aceptar una gran variedad de polipéptidos como sustratos, ya que la utilización de enzimas distintas para todos los enlaces péptidicos diferentes que tienen que ser hidrolizados en la degradación polipeptídica, representaría un gasto innecesario para la célula.

Sin embargo, las enzimas son generalmente de alta especificidad con relación al sustrato, tanto que una célula puede poseer casi tantas enzimas diferentes, como reacciones tiene que catalizar. Para una célula típica, son necesarias miles de enzimas diferentes para cumplir con todo su programa metabólico. En principio, parece un gasto superfluo tener que sintetizar tantas proteínas, almacenar tanta información genética y tener siempre a mano tantas enzimas en la célula. Pero esto implica enormes posibilidades de regulación, como veremos más adelante.

Diversidad enzimática y nomenclatura. No es sorprendente que hayan sido identificadas miles de enzimas, dada su especificidad y el amplio número de reacciones que ocurren dentro de una célula. Esta enorme diversidad de enzimas y funciones enzimáticas ha dado lugar a una gran variedad de combinaciones para nombrarlas, a medida que eran descubiertas y descritas. Algunas se denominaron según el sustrato, como por ejemplo *ribonucleasa*, *proteasa* y *amilasa.* Otras, como la *succinato deshidrogenasa* y la *fosfoglucoisomerasa*, se nombraron según sus funciones. Sin embargo, otras enzimas tienen nombres que no están en absoluto relacionados con sus sustratos o sus funciones. La *tripsina*, *catalasa*, y *lisozima* son enzimas de esta última categoría.

La proliferación de nombres comunes para las enzimas y la confusión resultante, hizo que la Unión Internacional de Bioquímica designara una Comisión Enzimática (EC), encargada de idear un sistema racional para nombrar las enzimas. El sistema EC está representado en la Tabla 6.1. Las enzimas se dividen dentro de seis clases principales basadas en sus funciones generales, con subgrupos para definir sus funciones más precisas. Las seis clases principales son *oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas* y *ligasas.* La Tabla 6.1 proporciona un ejemplo de cada clase, usando enzimas que catalizan reacciones se tratarán más tarde en el texto.

El sistema CE designa todas las enzimas conocidas con un número separado en cuatro partes. Por ejemplo, EC 3.4.17.1, es el código de la carboxipeptidasa A. Los primeros tres números definen la clase, subclase y sub-subclase, y el número final es el número de serie asignado a la enzima cuando fue añadida a la lista. Así, la carboxipeptidasa A es la primera entrada en la 17.ª sub-subclase de la cuarta subclase de la clase 3 (hidrolasas). La lista de enzimas que han sido clasificadas de esta forma, crece continuamente con las que van siendo descubiertas y caracterizadas.

Sensibilidad a la temperatura. Además de por su especificidad y diversidad, las enzimas se caracterizan también por su sensibilidad a la temperatura. Esta dependencia de la temperatura no es problemática para las enzimas de las células de mamíferos o aves, porque estos organismos son *homeotermos*, capaces de regular la temperatura corporal independientemente del medio ambiente. Sin embargo, los animales inferiores, las plantas, los protistas y las bacterias, funcionan a la temperatura de su medio ambiente, la cual puede variar mucho. Para estos organismos, la dependencia de la actividad enzimática de la temperatura es muy significativa.

La velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente aumenta con la temperatura, dentro de unos límites, porque el incremento en la energía cinética de las moléculas de la enzima y del sustrato, conduce a una mayor frecuencia en las colisiones, facilitando la unión correcta al sustrato. Sin embargo, se llega a un punto en el que el aumento de la temperatura es contraproducente, porque la molécula enzimática comienza a desnaturalizarse. Los puentes de hidrógeno se rompen, las interacciones hidrófobas cambian, y la integridad estructural del sitio activo se interrumpe, causando la pérdida de la actividad.

El rango de la temperatura por encima del cual una enzima se desnaturaliza varía mucho de una enzima a otra y de un organismo a otro. En la Figura 6.4a se compara la dependencia de la temperatura de una enzima típica del cuerpo humano, con una enzima típica de una bacteria termófila. La velocidad de reacción de una enzima humana es máxima alrededor de los 37 °C, que es la temperatura corporal normal. A partir de ahí el descenso brusco en su actividad refleja la progresiva desnaturalización de las moléculas enzimáticas. La mayoría de las enzimas de los seres homeotermos se inactivan por la temperatura, por encima de los 50-55 °C. Para tales enzimas, la inactivación por calor es sólo un fenómeno de laboratorio. Sin embargo, algunas enzimas son extraordinariamente sensibles al calor y se desnaturalizan e inactivan a temperaturas más bajas, en algunos casos, incluso a temperaturas corporales en personas con fiebre alta.

En el otro extremo del espectro, algunas enzimas conservan la actividad a temperaturas excepcionalmente altas. La curva verde en la Figura 6.4a representa la dependencia de la temperatura de una enzima propia de las arqueas termófilas, ya mencionadas en el Capítulo 4. ¡Estos organismos crecen en manantiales calientes ácidos a temperaturas tan altas como 80 °C! Evidentemente, cada una de las miles de enzimas que estos organismos necesitan para la actividad celular normal, deben ser capaces de funcionar a temperaturas a las que se desnaturalizan la mayoría de las enzimas en las células de otros organismos, incluido usted.

Sensibilidad al pH. Las enzimas también son sensibles al pH. Muchas sólo son activas dentro de un rango de pH de 3-4 unidades. Esta dependencia del pH se debe, normalmente, a la presencia de uno o más aminoácidos cargados en el sitio activo o en el propio sustrato. La actividad depende de cómo estén estos grupos, cargados o sin carga. Por ejemplo, en el sitio activo de la carboxipeptidasa A,

Tabla 6.1 Las principales categorías de enzimas con un ejemplo de cada una de ellas*

Clases	Tipo de reacción	Ejemplo: Nombre de la enzima	Ejemplo: Reacción catalizada
1. Oxidoreductasas	Reacciones de óxido-reducción	Alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1) (oxidación con NAD^+)	$CH_3{-}CH_2{-}OH \xrightleftharpoons{NAD^+ \;\; NADH + H^+} CH_3{-}C({=}O){-}H$ Etanol → Acetaldehído
2. Transferasas	Transfiere grupos funcionales desde una molécula a otra	Gliceroquinasa (EC 2.4.3.2) (fosforilación)	$HO{-}CH_2{-}CH(OH){-}CH_2{-}OH \xrightarrow{ATP \;\; ADP} HO{-}CH_2{-}CH(OH){-}CH_2{-}O{-}PO_3^{2-}$ Glicerol → Glicerol Fosfato
3. Hidrolasas	Ruptura hidrolítica de una molécula en dos	Carboxipeptidasa A (EC 3.4.17.1) (rompe enlaces peptídicos)	${-}NH{-}CH(R_{n-1}){-}C({=}O){-}NH{-}CH(R_n){-}C({=}O){-}O^- \xrightarrow{H_2O} {-}NH{-}CH(R_{n-1}){-}C({=}O){-}O^- + H_3N^+{-}CH(R_n){-}C({=}O){-}O^-$ Extremo C-terminal del polipéptido → Polipéptido acortado + Aminoácido C-terminal
4. Liasas	Eliminación de un grupo desde, o adición de un grupo a, una molécula, con redistribución de electrones	Piruvato descarboxilasa (EC 4.1.1.1) (decarboxilación)	$CH_3{-}C({=}O){-}C({=}O){-}O^- + H^+ \longrightarrow CH_3{-}C({=}O){-}H + CO_2$ Piruvato → Acetaldehído
5. Isomerasas	Desplazamiento de un grupo funcional dentro de una molécula	Maleato isomerasa (EC 5.2.1.1) (isomerización *cis-trans*)	$^-O{-}C({=}O){-}CH{=}CH{-}C({=}O){-}O^-$ (cis) $\rightleftharpoons$ $^-O{-}C({=}O){-}CH{=}CH{-}C({=}O){-}O^-$ (trans) Maleato ⇌ Fumarato
6. Ligasas	Unión de dos moléculas, para formar una única molécula	Piruvato carboxilasa (EC 6.4.1.1) (carboxilación)	$CH_3{-}C({=}O){-}C({=}O){-}O^- + CO_2 \xrightarrow{ATP \;\; ADP + P_i} {}^-O{-}C({=}O){-}CH_2{-}C({=}O){-}C({=}O){-}O^-$ Piruvato → Oxalacetato

* Este sistema de clasificación, identificación y asignación de números a las enzimas, fue concebido por la Comisión Enzimática de la Unión Internacional de Bioquímica.

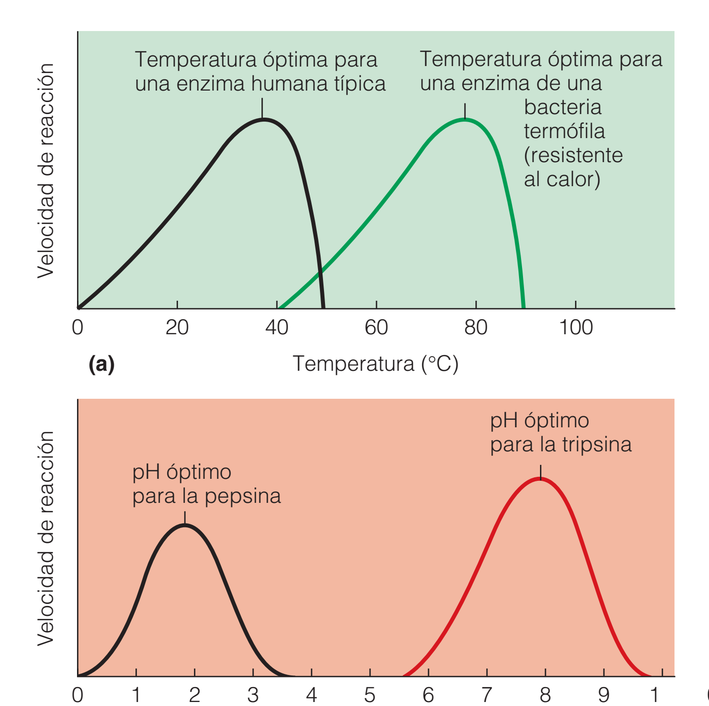


Figura 6.4 **Efecto de la temperatura y el pH en la velocidad de las reacciones catalizadas enzimáticamente.** (**a**) Efecto de la temperatura en la velocidad de una reacción catalizada por una enzima humana típica (en negro) y una enzima de una bacteria termófila (en verde). La tasa de reacción es máxima a la temperatura óptima, unos 37 °C en el caso humano (la temperatura de cuerpo) y unos 75 °C en la bacteria (la temperatura de un manantial termal). El incremento inicial de la actividad con la temperatura, es debido al aumento de la energía cinética en las moléculas de enzima y sustrato. Sin embargo, un aumento excesivo de la temperatura inactiva la reacción, pues la proteína de la enzima se desnaturaliza. (**b**) Efecto del pH en la velocidad de una reacción catalizada por la enzima gástrica pepsina (en negro) y la enzima intestinal tripsina (en rojo). La tasa de reacción es máxima al pH óptimo, aproximadamente 2,0 para la pepsina y 8,0 para la tripsina. El pH óptimo para una enzima se corresponde con la concentración de protones a la cual los grupos ionizables, tanto de la enzima, como del sustrato, están en la configuración más favorable para reaccionar. Los valores de pH lejos del óptimo producen, en general, modificaciones en los grupos cargados de la enzima, el sustrato o ambos. El grado óptimo pH de una enzima suele ser el mismo que el del compartimiento celular, o el medio externo, en el que la enzima es activa.

aparecen los grupos carboxilos de dos residuos glutamato. Estos grupos carboxilos deben estar presentes en la forma cargada (ionizados), de forma que la enzima se inactiva si el pH disminuye hasta el valor en el cual los grupos carboxilo del glutamato en la mayoría de las moléculas enzimáticas, están protonados y, por tanto, sin carga.

Como se podría esperar, la dependencia de pH de una enzima normalmente refleja el medio ambiente en el cual la enzima está activa. La Figura 6.4b muestra la dependencia de pH de dos enzimas que degradan proteínas, encontradas en el tracto digestivo humano. La pepsina (línea negra) está presente en el estómago, donde el pH normalmente tiene valores en torno a 2, mientras que la tripsina (línea roja) es secretada en el intestino delgado, el cual tiene un pH en torno a 8. Ambas enzimas son activas en un rango de casi 4 unidades de pH, pero difieren mucho en su pH óptimo, consecuente con las condiciones propias de sus respectivas localizaciones dentro del cuerpo.

Sensibilidad a otros factores. Otra de las características de las enzimas es su sensibilidad a otros factores, además de a la temperatura y pH, como las sustancias inhibidoras o activadoras de la enzima, un aspecto al cual volveremos más tarde en el capítulo. En el caso de enzimas con especificidad por determinados grupos, la actividad también se puede ver afectada por la presencia de sustratos alternativos. La mayoría de las enzimas son sensibles al medio ambiente iónico, el cual es probablemente el que afecta a la conformación total de la enzima, debido a que los puentes de hidrógeno dependen de él. El medio ambiente iónico puede afectar también a las uniones del sustrato porque las interacciones iónicas están a menudo involucradas en las uniones entre el sustrato y el sitio activo.

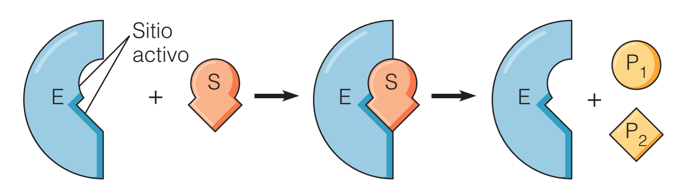
La unión del sustrato, la activación y la reacción se producen en el sitio activo

Las enzimas son catalizadores muy eficaces, gracias a que los sustratos encajan de forma precisa con el sitio activo de las enzimas. Esta eficacia se puede observar en toda su extensión, si comparamos la catálisis enzimática con la catálisis inorgánica. Como apuntamos anteriormente, las reacciones catalizadas enzimáticamente progresan a una velocidad de 10^7 a 10^{14} veces más rápido que las reacciones no catalizadas, mientras que las que utilizan catalizadores inorgánicos, son de 10^3 a 10^4 veces más rápido. Como usted puede adivinar, la mayor parte del interés por las enzimas, se centra en el sitio activo, donde ocurren la unión, activación y transformación química del sustrato.

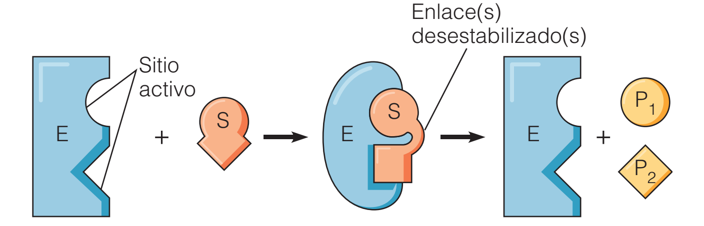
La unión del sustrato. El contacto inicial entre el sitio activo de una enzima y una molécula de sustrato potencial, depende de colisiones aleatorias. Sin embargo, una vez en la hendidura o bolsillo del sitio activo, las moléculas de sustrato se unen temporalmente a la superficie de la enzima, con la orientación apropiada para interaccionar entre sí y con grupos catalíticos específicos de la enzima, lo cual facilita la reacción. La unión del sustrato suele realizarse a través de aminoácidos cargados, por medio de puentes de hidrógeno o enlaces iónicos (o ambos). Estas uniones son, en general, débiles, pero la suma de varias de ellas es suficiente para mantener a la molécula en su lugar. La fuerza de unión entre una enzima y una molécula de sustrato, suele encontrarse en el rango de 3-12 kcal/mol, menos de un décimo de la fuerza de un enlace covalente (*véase* Figura 2.2). Por tanto, la unión al sustrato es fácilmente reversible.

Durante muchos años, los enzimólogos consideraron el sitio activo como una estructura rígida. Comparaban el ajuste de un sustrato dentro del sitio activo a una llave dentro de una cerradura, analogía sugerida en 1894 por el bioquímico alemán Emil Fischer. Este *modelo de cerradura y llave*, mostrado en la Figura 6.5a, explicó la especificidad enzimática pero hizo poco para acrecentar nuestro conocimiento del evento catalítico. Un punto de vista más útil acerca de la interacción enzima-sustrato es el provisto por el **modelo de ajuste inducido,** propuesto en 1985 por Daniel Koshland. Como ilustra la Figura 6.5b, este modelo supone que la unión inicial de la(s) molécula(s) de sustrato al sitio activo deforma la enzima y el sustrato, estabilizando a las moléculas de sustrato en su estado de transición y permitiendo que los enlaces críticos sean más susceptibles a ataques catalíticos.

La distorsión de la enzima implica un cambio conformacional en la misma y, por tanto, en la configuración del sitio activo. Este cambio posiciona de forma óptima a los grupos reactivos apropiados de la enzima, para la reacción catalítica en la cual intervienen, aumentando así la probabilidad de que la reacción se produzca. El cambio conformacional acerca al sitio activo a las cadenas laterales de los aminoácidos que son críticos para el proceso catalítico, pero que no están en las proximidades del sitio activo en la conformación no inducida. En muchos casos, estas cadenas laterales son grupos ácidos o básicos, que promueven la catálisis. En el caso de la carboxipeptidasa A, la unión del sustrato atrae a tres residuos aminoacílicos críticos al sitio activo (una arginina, un glutamato y una tirosina).



(a) Modelo de cerradura y llave



(b) Modelo de ajuste inducido

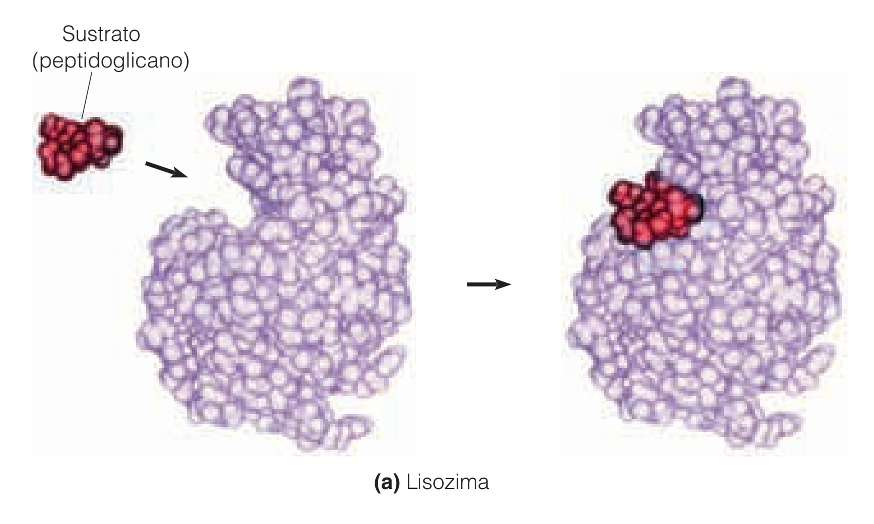
Figura 6.5 Dos modelos de interacción enzima-sustrato. (**a**) El modelo de cerradura y llave. En este modelo clásico, la molécula enzimática (E) era considerada una estructura rígida, con un sitio activo, donde encajaba el sustrato (S), análogamente a como lo hace una llave en una cerradura. La reacción en el sitio activo, convierte a las moléculas de sustrato en moléculas de producto (P_1 y P_2). (**b**) El modelo de ajuste inducido. Según este modelo, la unión de una molécula de sustrato al sitio activo de una enzima, induce un cambio conformacional en ésta, que sitúa en el sitio activo a los grupos reactivos adecuados, de manera óptima para la reacción catalizada. Además, el ajuste estrecho entre la enzima y el sustrato desestabiliza uno o más de los enlaces del sustrato, haciendo que sean más susceptibles a un ataque catalítico.

Los estudios de difracción de rayos x de proteínas cristalizadas han confirmado que realmente se producen estos cambios, durante la unión del sustrato. La cristalografía con rayos X se usa para determinar la forma de una molécula enzimática con o sin sustrato unido al sitio activo. La Figura 6.6 ilustra los cambios conformacionales que tienen lugar tras la unión del sustrato a la *lisozima*, la enzima ya mostrada en la Figura 6.2a, y para la hexoquinasa, una enzima que podremos encontrar de nuevo más adelante en este capítulo. En ambos casos se produce un cambio notorio en la conformación de la molécula proteica, como respuesta a la unión del sustrato. En el caso de la hexoquinasa, por ejemplo, la unión del sustrato (una molécula de D-glucosa) provoca que dos de los dominios de la enzima se doblen el uno hacia el otro, cerrando el pliegue del sitio de unión alrededor del sustrato (Figura 6.6b).

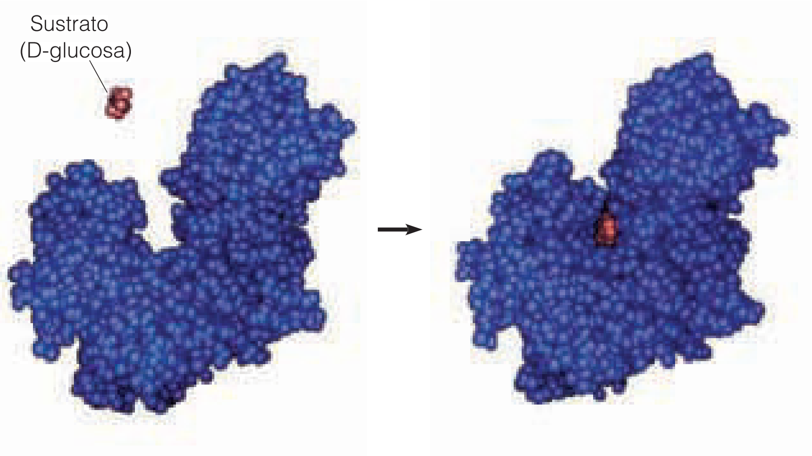
El cambio conformacional al producirse la unión del sustrato, puede resultar en un desplazamiento extenso de grupos de aminoácidos dentro de la molécula proteica. ¡En el caso de la carboxipeptidasa A, por ejemplo, la unión del sustrato hace que el residuo de tirosina de la posición 248 se mueva a 1,2 nm, ¡una distancia aproximadamente igual a una cuarta parte del diámetro de la molécula enzimática!

Activación del sustrato. El papel del sitio activo no es sólo reconocer y unir el sustrato apropiado sino también *activarlo*, sumergiéndolo en el medio químico necesario para la catálisis. Una determinada reacción catalizada enzimáticamente, puede involucrar a uno o más recursos de **activación del sustrato**. Los tres mecanismos más comunes son los siguientes:

1. El cambio en la conformación enzimática inducida por la unión del inicial sustrato al sitio activo, no sólo causa una mejor complementariedad y un ajuste más estrecho enzima-sustrato, sino que también deforma uno o más de sus enlaces, debilitando así dichos enlaces, haciéndolos más susceptible al ataque catalítico.
2. La enzima también puede aceptar o donar protones incrementando, por tanto, la reactividad química del sustrato. Esto da cuenta de la importancia de los aminoácidos cargados en la química del sitio activo, lo cual, a su vez, explica por qué la actividad de la enzima suele ser tan dependiente del pH.
3. Como forma adicional para la activación del sustrato, las enzimas también pueden aceptar o donar electrones, formando de ese modo enlaces covalentes temporales entre la enzima y su sustrato. El mecanismo necesita que el sustrato tenga una región



(a) Lisozima



(b) Hexoquinasa

Figura 6.6 Cambio conformacional en la estructura de la enzima, inducido por la unión del sustrato. Aquí se muestran los modelos compactos de las enzimas: (**a**) lisozima y (**b**) hexoquinasa y sus sustratos (un peptidoglicano artificial y una molécula de D-glucosa, respectivamente). En ambos casos, la unión del sustrato induce un cambio conformacional en la enzima, detectable por análisis de difracción con rayos-X.

que sea electropositiva (deficiente en electrones) o electronegativa (rica en electrones) y que el sitio activo de la enzima tenga uno o más grupos de polaridad opuesta.

El acontecimiento catalítico. La secuencia de acontecimientos que tienen lugar en el sitio activo, se ilustra en la Figura 6.7, tomando como ejemplo a la enzima sacarasa. La sacarasa hidroliza el disacárido sacarosa en glucosa y fructosa. Hasta el momento, hemos visto que la colisión inicial aleatoria de una molécula de sustrato —sacarosa, en este caso— con el sitio activo, tiene como resultado su unión a residuos aminoacílicos que están posicionados estratégicamente allí (Paso 1). La unión del sustrato induce un cambio en la conformación enzimática que intensifica el ajuste entre la molécula sustrato y el sitio activo, facilitando de ese modo la conversión del sustrato en los productos, en este caso glucosa y fructosa (Paso 2). Después, estos productos se liberan desde el sitio activo (Paso 3), permitiendo que la molécula enzimática regrese a su conformación original, quedando el sitio activo ahora disponible para admitir otra molécula de sustrato (Paso 4). ¡La secuencia completa de acontecimientos tiene lugar en un tiempo lo suficientemente corto para permitir que en el sitio activo de una sola molécula enzimática ocurran cientos, o incluso miles, de tales reacciones por segundo!

Cinética enzimática

Hasta el momento, nuestra exposición acerca de las enzimas ha sido básicamente descriptiva. Hemos hablado del requerimiento de energía de activación que evita que las reacciones termodinámicamente factibles ocurran, y de los catalizadores como medio de reducir la energía de activación y de ese modo facilitar dichas reacciones. También hemos considerado a las enzimas como catalizadores biológicos y hemos examinado su estructura y función con más detalle. Además, nos hemos dado cuenta de que las únicas reacciones que probablemente ocurren en las células a velocidades razonables, son aquellas para las cuales las enzimas específicas están al alcance de la mano, de manera que la capacidad metabólica de una célula, está especificada por las enzimas que están presentes.

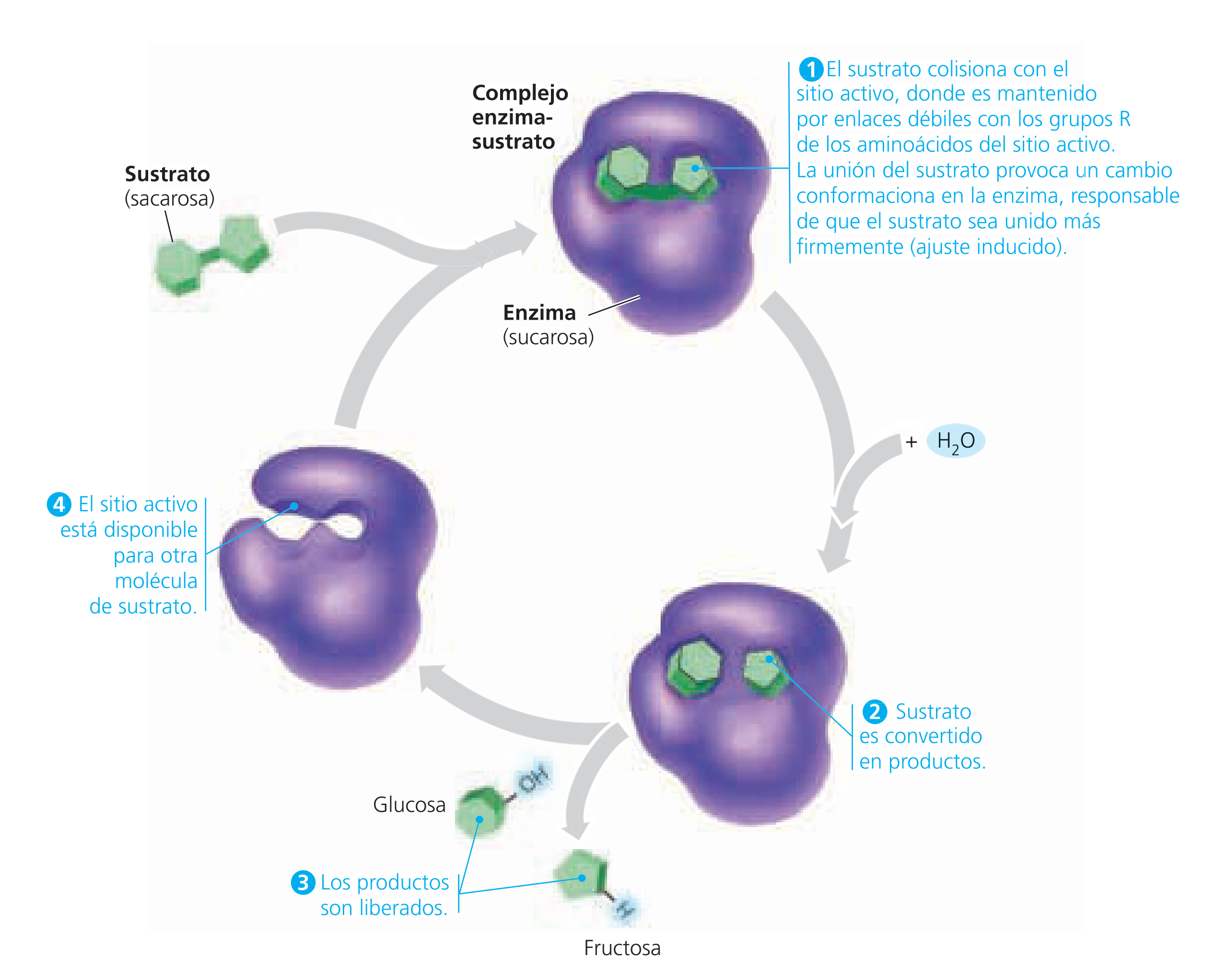


Figura 6.7 **Ciclo catalítico de una enzima.** En este ejemplo, la enzima sacarasa cataliza la hidrólisis de sacarosa en glucosa y fructosa.

Incluso cuando faltan las enzimas podemos servirnos de su ausencia para calcular, por comparación, la velocidad real a la cual tiene lugar una reacción catalizada enzimáticamente y cuál es el efecto ejercido por determinados factores en la velocidad de reacción. La simple presencia de la enzima apropiada en la célula no asegura que una determinada reacción pueda ocurrir a una velocidad adecuada, a menos que también podamos estar seguros de que las condiciones celulares son favorables para la actividad enzimática. Ya hemos visto que hay factores que pueden influir en la actividad enzimática, tales como la temperatura o el pH. Ahora estamos preparados para valorar cómo la actividad enzimática también depende de la concentración de los sustratos, de los productos y de los inhibidores presentes en la célula. Además, veremos cómo, al menos algunos de estos efectos, pueden ser definidos cuantitativamente.

Cuando dirigimos nuestra atención a estos aspectos cuantitativos de la catálisis enzimática, nos encontraremos en el campo de la **cinética enzimática.** La palabra *cinética* es de origen griego (*Kinetikos*, significa «movimiento»). Aplicada a las reacciones químicas, la cinética concierne a las velocidades de reacción y la manera en que esas velocidades están influidas por varios factores, pero especialmente por la concentración del sustrato, de los productos y de los inhibidores. Aquí nos centraremos, mayoritariamente, en los efectos de la concentración del sustrato en la cinética de las reacciones catalizadas enzimáticamente. Nuestro estudio estará limitado a las *velocidades iniciales de reacción*, medidas alrededor de un periodo de tiempo en el cual la concentración de sustrato todavía no ha disminuido lo suficiente para afectar a la velocidad, y la acumulación de producto es todavía pequeña para provocar una reacción apreciable, en sentido contrario. Aunque esto es una simplificación de lo que ocurre realmente, nos permitirá entender algunos principios importantes de la cinética enzimática.

La cinética enzimática puede parecer bastante compleja al principio. Para ayudarle a entender los conceptos básicos, en el Anexo 6A se plantea un símil, en el cual, las enzimas que actúan sobre las moléculas de sustrato, se comparan con una habitación llena de monos pelando cacahuetes. Puede resultarle útil recurrir a la analogía ahora y regresar después a esta sección.

Monos y cacahuetes

Si le pareció de utilidad el ejemplo de los frijoles saltarines mejicanos, para entender el concepto de energía libre del Capítulo 5, quizá aprecie la aproximación a la cinética enzimática basada en la analogía con una habitación repleta de monos («enzimas») y una cantidad variable de cacahuetes pelados («sustratos»). Trate de entender cada paso, primero en términos de monos pelando cacahuetes, y luego como una auténtica reacción, catalizada enzimáticamente.

La Galería del Cacahuete

Para nuestro modelo, necesitamos una tropa de diez monos, todos igualmente expertos en encontrar y pelar cacahuetes. Suponemos también que los monos son incapaces de comer, siquiera, uno solo de los cacahuetes que pelan, pero pese a todo, sufren una necesidad compulsiva de seguir pelando. (Para hacer el modelo algo más riguroso, podemos insistir que los cacahuetes son una nueva variedad híbrida, que se puede recomponer fácilmente, y que los monos, lo mismo están colocando los cacahuetes dentro de sus cáscaras, que pelándolos. Pero estas consideraciones no nos preocupan aquí; sólo estamos interesados en las condiciones iniciales en las cuales todos los cacahuetes están dentro de sus cáscaras.)

Necesitaremos también la Galería de Cacahuetes, una habitación de superficie conocida y en la cual los cacahuetes se distribuyen homogéneamente en el suelo. El número de cacahuetes variará a medida que avancemos, pero en todo momento, en la habitación habrá muchos más cacahuetes que monos. Además, dado que conocemos el número de cacahuetes y la superficie del suelo, podremos calcular «la concentración» (para ser más exactos, la densidad) de cacahuetes en la habitación. En cada caso, los monos comienzan en una sala de espera contigua. Para empezar el ensayo, simplemente abrimos la puerta y permitimos que los ansiosos monos pasen a la Galería de Cacahuetes.

Comienza el pelado de cacahuetes

Ya estamos listos para nuestro primer análisis. Comenzamos con una concentración inicial de un cacahuete por metro cuadrado, y asumimos que, con esta concentración, un mono tarda como media 9 segundos en encontrar un cacahuete y 1 segundo en pelarlo. Esto significa que cada mono necesita 10 segundos por cacahuete y por tanto puede pelarlos a una velocidad de 0,1 cacahuetes por segundo. Como hay 10 monos en la galería, la velocidad v de pelado de cacahuetes para el total de los monos es de 1 cacahuete por segundo, con esta concentración de cacahuetes (la cual llamanos [S] para recordar que los cacahuetes son el sustrato de la acción de pelar). Todo esto se puede tabular como sigue:

[S] = concentración de cacahuetes (cacahuetes/m^2)	1
Tiempo requerido por cacahuete:	
Para encontrarlo (segundo/cacahuete)	9
Para pelarlo (segundo/cacahuete)	1
Total (segundo/cacahuete)	10
Velocidad de pelado:	
Por mono (cacahuete/segundo)	0,10
Total (v)	1,0

Aumenta el número de cacahuetes

Para nuestro segundo ensayo, llevamos a todos los monos de vuelta a la sala de espera, barremos los desperdicios, y empezamos ahora con una concentración de 3 cacahuetes por

La mayoría de las enzimas siguen la cinética de Michaelis-Menten

Desde hace mucho tiempo se sabe que la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente, aumenta con la concentración de sustrato, pero de tal forma, que cada incremento adicional de sustrato, da como resultado un aumento menor de la velocidad de reacción. De manera más precisa, se puede observar experimentalmente que la relación entre la **velocidad inicial de reacción v** y la **concentración de sustrato [S]** es una hipérbole, como se ilustra en la Figura 6.8. Una propiedad importante de esta relación hiperbólica es que a medida que [S] tiende hacia el infinito, v tiende hacia un valor máximo, que depende del número de moléculas enzimáticas y, por tanto, sólo puede incrementarse añadiendo más enzima.

La incapacidad para aumentar la velocidad de reacción más allá de un valor finito máximo a concentraciones de sustrato cada vez más altas, se llama **saturación.** Ésta es una característica fundamental de las reacciones catalizadas enzimáticamente. Las reacciones catalizadas siempre llegan a saturación a concentraciones altas de sustrato, mientras que esto no ocurre en las reacciones no catalizadas.

Gran parte de nuestra comprensión de la relación hiperbólica entre [S] y v se debe a los trabajos pioneros de dos enzimólogos alemanes, Leonor Michaelis y Maud Menten. En 1913, postularon una teoría general de la acción enzimática, que ha resultado ser la base para el análisis cuantitativo de casi todos los aspectos de la cinética enzimática. Para entender su enfoque, considere una de las posibles reacciones catalizadas enzimáticamente más simples, en la cual un único sustrato S se convierte en un único producto P.

$$S \xrightarrow[\text{Enzima (E)}]{} P \qquad (6.5)$$

metro cuadrado. Como la cantidad de cacahuetes se ha triplicado, cada mono podrá encontrar un cacahuete tres veces más rápidamente que antes, es decir, que el tiempo que emplean en encontrar el cacahuete, ahora es de sólo 3 segundos. Dado que se sigue empleando 1 segundo en pelar cada cacahuete, el tiempo total por cacahuete es ahora de 4 segundos y la velocidad de pelado es 0,25 cacahuetes por segundo y mono, es decir, 2,5 cacahuetes por segundo para el total de los de monos. Esto genera otra columna de entradas para nuestra tabla de datos:

[S] = concentración de cacahuetes (cacahuetes/m^2)	1	3
Tiempo requerido por cacahuete:		
Para encontrarlo (segundo/cacahuete)	9	3
Para pelarlo (segundo/cacahuete)	1	1
Total (segundo/cacahuete)	10	4
Velocidad de pelado:		
Por mono (cacahuete/segundo)	0,10	0,25
Total (v)	1,0	2,5

¿Qué ocurre si v y [S] continúan aumentando?

Para descubrir qué ocurre finalmente con la velocidad de pelado si la concentración de cacahuetes en la galería es cada vez mayor, lo único que hay que hacer es ampliar la tabla de datos, suponiendo un incremento de los valores de [S] y calculando la correspondiente v. Por ejemplo, una concentración triplicada de cacahuetes (de 3 a 9 cacahuetes/m^2) conduce a una reducción del tiempo necesario por cacahuete, que ahora será de 2 segundos (1 segundo para encontrarlo y otro segundo para pelarlo), con una velocidad de pelado de 0,5 cacahuetes por segundo y mono, o 5 cacahuetes por segundo en total.

Ya se empieza a ver una tendencia. El primer triplicado de la concentración de cacahuetes aumentó la velocidad 2,5 veces, pero el siguiente triplicado sólo la dobla. Es decir, que la progresión no es lineal. Puede ver esto claramente si elige una concentración algo mayor de cacahuetes y representa v en el eje y (escala sugerida: 0-10 cacahuetes/segundo) y [S] en el eje x (escala sugerida: 0-100 cacahuetes/m^2). Como verá, los datos generan una curva hiperbólica muy parecida a la de la Figura 6.8, y si observa cuidadosamente sus datos, verá por qué la curva continúa «doblándose» a medida que [S] incrementa (es decir, porque la velocidad incrementa progresivamente menos conforme aumenta el número de cacahuetes): el tiempo de pelado es fijo y por tanto llega a ser un componente cada vez más importante del total del tiempo empleado por cacahuete mientras que el tiempo para encontrarlo, es cada vez menor. Es precisamente este tiempo fijo de pelado el que establece el límite superior en la velocidad de procesamiento del cacahuete, porque incluso si [S] fuera infinita (o sea, en un mundo repleto de cacahuetes), todavía se precisaría un tiempo finito de 1 segundo para procesar cada cacahuete.

Por último, usted puede darse cuenta de que hay algo especial en la concentración de cacahuetes a la cual, el tiempo para encontrarlos, es exactamente igual al tiempo de pelado (ésta resulta ser de 9 cacahuetes/m^2). Éste es el punto de la curva en el cual la velocidad de procesamiento del cacahuete es exactamente la mitad de la velocidad máxima. De hecho, es una referencia tan importante en la escala de concentración, que usted podría estar tentado de darle un nombre especial, sobre todo si se llamara Michaelis y ¡estuviera haciendo el mono con enzimas en vez de con cacahuetes!

Según la hipótesis de Michaelis-Menten, la enzima E que cataliza esta reacción reacciona primero con el sustrato S, formando un complejo enzima-sustrato transitorio, ES, que sufre luego la reacción catalítica real, para formar la enzima libre y el producto P, como se muestra en la secuencia

$$E_f + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_4}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} E_f + P \quad \textbf{(6.6)}$$

donde E_f es la forma libre de la enzima, S es el sustrato, ES es el complejo enzima-sustrato, P es el producto, y k_1, k_2, k_3 y k_4 son las constantes de velocidad para las reacciones indicadas.

Comenzando con este modelo y suponiendo varias simplificaciones, Michaelis y Menten llegaron a la siguiente relación entre la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente y la concentración de sustrato:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}. \quad \textbf{(6.7)}$$

Aquí, [S] es la concentración inicial de sustrato, v es la velocidad inicial de reacción a esa concentración de sustrato, y V_{max} y K_m son parámetros cinéticos importantes que consideraremos en la próxima sección. Ésta es la **ecuación Michaelis-Menten,** la principal de la cinética enzimática. (El Problema 6.11 al final del capítulo le dará una oportunidad para deducir por sí mismo la ecuación de Michaelis-Menten.)

¿Cuál es el significado de V_{max} y K_m?

Para valorar las consecuencias de la relación entre v y [S] y examinar el significado de los parámetros V_{max} y K_m, podemos considerar tres casos especiales de concentración de sustrato: concentración de sustrato muy baja, concentración de sustrato muy alta y el caso especial de $[S] = K_m$.

Caso 1: concentración de sustrato muy baja ($[S] \ll K_m$). A concentración de sustrato muy baja, [S] es despreciable

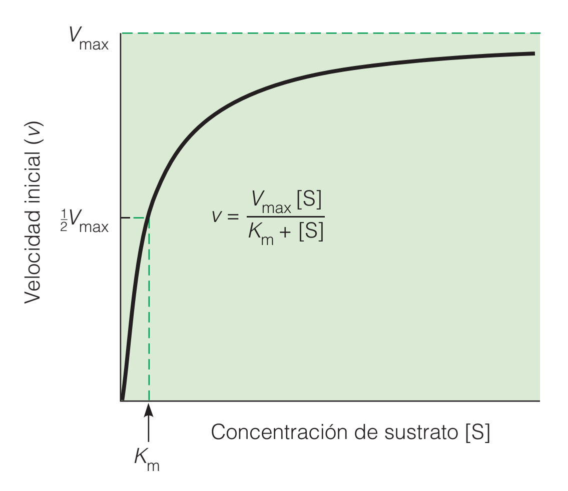


Figura 6.8 Relación entre la velocidad de reacción y la concentración de sustrato. Para una reacción catalizada enzimáticamente, que sigue la cinética de Michaelis-Menten, la velocidad inicial tiende hacia un límite superior de velocidad V_{max} a medida que la concentración de sustrato [S] tiende hacia el infinito. La constante de Michaelis-Menten K_m corresponde a la concentración de sustrato para la cual la reacción tiene lugar a la mitad de la velocidad máxima.

comparada con la constante K_m del denominador de la ecuación de Michaelis-Menten, por lo que podemos escribir

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \cong \frac{V_{max}[S]}{K_m}. \qquad \textbf{(6.8)}$$

Por tanto, a concentración de sustrato muy baja, la velocidad inicial de reacción es más o menos proporcional a la concentración de sustrato. Ésta es, por tanto, la *región de primer orden* de la gráfica de Michaelis-Menten. Mientras la concentración del sustrato sea mucho más baja que el valor de K_m, la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente, aumenta casi linealmente con la concentración de sustrato.

Caso 2: Concentración de sustrato muy alta ([S] ≫ K_m). A concentraciones de sustrato muy altas, K_m se vuelve insignificante comparada con [S] en el denominador de la ecuación de Michaelis-Menten, y podremos escribir:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \cong \frac{V_{max}[S]}{[S]} = V_{max}. \qquad \textbf{(6.9)}$$

Esta relación significa que, a concentraciones de sustrato muy altas, la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente, es esencialmente independiente de la variación de la [S], volviéndose casi constante. Ésta constituye la *región de orden cero* de la representación de Michaelis-Menten. Mientras la concentración de sustrato sea mucho mayor que el valor de K_m, la velocidad no se ve afectada por los cambios en la concentración de sustrato, permaneciendo casi constante, con valores próximos a V_{max}.

Esto nos proporciona una definición de V_{max}, uno de los dos parámetros cinéticos de la ecuación de Michaelis-Menten. V_{max} es la velocidad máxima, o el valor límite superior, al cual tiende la velocidad de reacción inicial v cuando la concentración del sustrato [S] se acerca al infinito. En otras palabras, V_{max} es la velocidad a concentración saturante de sustrato. En estas condiciones, toda molécula enzimática está ocupada, casi todo el tiempo, en el proceso real de la catálisis, puesto que la concentración de sustrato es tan alta que, casi a la vez que se libera una molécula de producto, llega otra molécula de sustrato al sitio activo.

Por tanto, el límite superior de V_{max} se determina por 1) el tiempo necesario para la reacción catalítica real más la liberación subsiguiente del producto desde la superficie de cada molécula de enzima, y 2) el número de moléculas presentes. Debido a que la velocidad real de la reacción es limitada, la única manera de que la V_{max} pueda aumentar es incrementando la concentración de la enzima. De hecho, V_{max} es linealmente proporcional a la cantidad de enzima presente, como se muestra en la Figura 6.9.

Caso 3: ([S] = K_m). Hasta el momento, hemos visto la razón para la cinética de las reacciones de primer orden a concentraciones de sustrato bajas y para cinéticas de orden cero a concentraciones altas. También hemos formulado la definición para V_{max}, pero todavía tenemos que descubrir el significado del segundo parámetro cinético, K_m. Fíjese que con independencia de su significado, K_m parece tener algo que ver con la determinación de cuánto de baja debe ser la concentración de sustrato, para asegurar la cinética de primer orden, o bien, cuánto de alta debe ser, para asegurar la cinética de orden cero. De esta manera, K_m parece ser un punto de referencia en la escala de concentración que determina cuánto de alto es alto y cuánto de bajo es bajo. Para explorar su significado de manera más precisa, considere el caso especial en el que [S] es exactamente

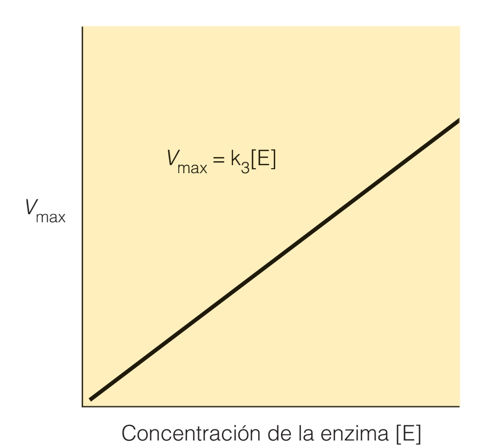


Figura 6.9 Relación lineal entre V_{max} y la concentración enzimática. El incremento lineal en la velocidad de reacción en función de la concentración de la enzima, proporciona la base para determinar, experimentalmente, las concentraciones de enzima.

igual a K_m. Bajo estas condiciones, la ecuación de Michaelis-Menten se puede escribir como

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{max}[S]}{2[S]} = \frac{V_{max}}{2}. \quad \textbf{(6.10)}$$

Esta ecuación nos proporciona la definición que hemos estado buscando: K_m es la concentración de sustrato para la cual la reacción tiene lugar a la mitad de su velocidad máxima. Esta concentración es un valor fijo para cada enzima que cataliza una reacción determinada bajo unas condiciones específicas y se denomina **constante de Michaelis** (de ahí su abreviatura K_m) en honor al enzimólogo que dilucidó su significado. La Figura 6.8 ilustra el significado de V_{max} y de K_m.

¿Por qué son importantes V_{max} y K_m para los Biólogos celulares?

Ahora que entendemos lo que significan V_{max} y K_m, debemos preguntarnos por qué estos parámetros cinéticos son importantes para los biólogos celulares. El valor de K_m es útil, porque nos permite calcular en qué parte en la representación de Michaelis-Menten de la Figura 6.9, está funcionando una enzima (suponiendo, por supuesto, que la concentración de sustrato en la célula es conocida). Podemos entonces calcular a que fracción de la velocidad máxima es probable que la reacción catalizada enzimáticamente tenga lugar en la célula. Además, K_m se puede considerar como un cálculo aproximado de la «calidad» es una enzima, en el sentido de que, cuanto más bajo es el valor K_m, más bajo es el rango de concentración de sustrato en el cual la enzima es eficaz*. Los valores de K_m para varias enzimas aparecen en la Tabla 6.2.

La V_{max} de una reacción particular nos proporciona una medida de la tasa de reacción. Realmente son pocas las enzimas que se encuentran, in vivo, con concentraciones saturantes de sustrato, de manera que las enzimas raramente van a funcionar lejos de sus velocidades máximas, en condiciones celulares. Sin embargo, conociendo los valores de V_{max}, K_m, y la concentración de sustrato en vivo, podremos al menos estimar la velocidad probable de la reacción, en dichas condiciones celulares.

V_{max} también puede usarse para determinar otro parámetro útil llamado **número de recambio** (**K_{cat}**), que expresa la velocidad a la cual las moléculas de sustrato se convierten en producto por una única molécula de enzima, cuando ésta está funcionando a su máxima velocidad. La constante k_{cat} se expresa en unidades de tiempo inverso (s^{-1}, por ejemplo) y se calcula como el cociente entre V_{max} y $[E_t]$, la concentración de la enzima en moles/litro:

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E_t]} \quad \textbf{(6.11)}$$

El número de recambio varía mucho entre enzimas, como se aprecia en los ejemplos dados en la Tabla 6.2.

La gráfica doble recíproca es una forma útil de representar los datos cinéticos

La gráfica clásica de Michaelis-Menten de v frente a [S], tal y como se muestra en la Figura 6.8, es una representación fiel de cómo la velocidad depende de la concentración de sustrato, pero no es una herramienta especialmente útil para la determinación cuantitativa de los parámetros cinéticos claves K_m y V_{max}. Su forma hiperbólica hace difícil extrapolar con precisión el parámetro crítico V_{max}, a concentración infinita de sustrato, y si V_{max} no es conocida con precisión, K_m no se puede determinar. Este problema se aprecia en la Figura 6.9, en la que sería difícil calcular V_{max} si no estuviera ya dibujada, y sin V_{max}, K_m tampoco puede ser calculada fácilmente.

Para solucionar este problema y proporcionar un enfoque gráfico más útil, Hans Lineweaver y Dean Burk convirtieron la relación hiperbólica de la ecuación de Michaelis-Menten en una función lineal invirtiendo ambos lados de la Ecuación 6.7 y simplificando la expresión resultante con la forma de una ecuación para una línea recta:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_{max}[S]} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{[S]}{V_{max}[S]}$$

$$= \frac{K_m}{V_{max}}\left(\frac{1}{[S]}\right) + \frac{1}{V_{max}} \quad \textbf{(6.12)}$$

Tabla 6.2 Valores de K_m y k_{cat} para algunas enzimas

Nombre de la enzima	Sustrato	K_m (M)	$k_{cat}(s^{-1})$
Acetilcolinesterasa	Acetilcolina	9×10^{-5}	$1{,}49 \times 10^{-4}$
Anidrasa carbónica	CO_2	1×10^{-2}	1×10^{6}
Fumarasa	Fumarato	5×10^{-6}	8×10^{2}
Triosa fosfato isomerasa	Gliceraldehído 3-fosfato	5×10^{-4}	$4{,}3 \times 10^{3}$
β-lactamasa	Bencilpenicilina	2×10^{-5}	2×10^{3}

* K_m se considera a menudo como una medida de la afinidad de una enzima por sus sustratos, es decir, como la constante de disociación para ES. Sin embargo, es una relación de las constantes de velocidades: $K_m = (k_2 + k_3)/k_1$. Para conocer las consecuencias de esta relación, *véase* el Problema 6.11 al final del capítulo.

La Ecuación 6.12 es la **ecuación de Lineweaver-Burk.** Cuando ésta se representa como $1/v$ frente a $1/[S]$, como en la Figura 6.10, la gráfica **doble recíproca resultante** es lineal, con una intersección de $1/V_{max}$ con el eje *y*, otra de $-1/K_m$, con el eje *x*, y una pendiente K_m/V_{max}. (Puede convencerse a sí mismo de estos valores de intersección estableciendo primero $1/[S]$, igualando $1/v$ a cero en la Ecuación 6.12 y resolviendo luego el otro valor.) Por tanto, una vez que se ha dibujado la representación doble recíproca, V_{max} se puede determinar directamente a partir del recíproco de la intersección con el eje *y*, y K_m a partir del recíproco negativo de la intersección con el eje *x*. Además, la pendiente se puede usar para comprobar ambos valores.

De esta manera, la representación de Lineweaver-Burk es útil porque confirma mediante su linealidad que la reacción en cuestión está siguiendo la cinética Michaelis-Menten, y permite determinar los parámetros V_{max} y K_m sin la complicación de una curva hiperbólica. También sirve como un diagnóstico útil en el análisis de la inhibición enzimática, porque la forma de la representación se ve afectada de forma característica, por varias tipos diferentes de inhibidores reversibles.

Sin embargo, la ecuación de Lineweaver-Burk tiene algunas limitaciones. El principal problema es que, a menudo, se precisa una extrapolación elevada para determinar K_m, por lo que el resultado puede ser poco fiable. Además, los datos más cruciales en la determinación de la pendiente de la curva suelen ser los más alejados del eje *y*; éstos se corresponden con las concentraciones más bajas de sustrato y los niveles bajos de la actividad enzimática, y por tanto, con los valores más inciertos.

Para sortear estas desventajas, se han propuesto varias alternativas a la ecuación de Lineweaver-Burk. Una de ellas es la ecuación de Eadie-Hofstee, que se representa como una gráfica de $v/[S]$ frente a v. Como se ilustra en la Figura 6.11, V_{max} se determina por la intersección con el eje *x* y K_m a partir de la pendiente. (Para explorar la representación de Eadie-Hofstee y otra alternativa más a la representación Lineweaver-Burk, vea el Problema 6.12, al final de este capítulo.)

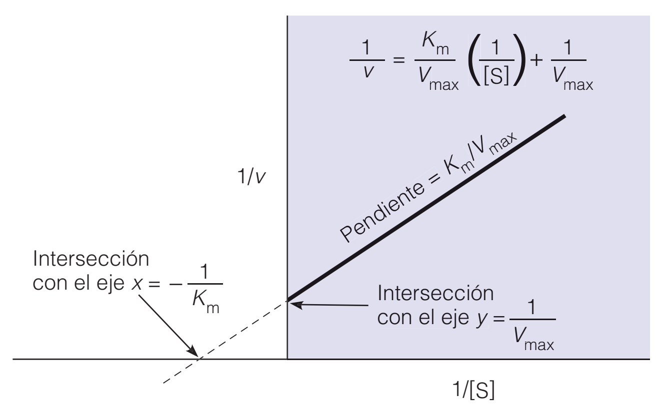


Figura 6.10 Representación doble recíproca de Lineweaver-Burk. El recíproco de la velocidad inicial $1/v$, se representa como una función del recíproco de la concentración de sustrato, $1/[S]$. K_m puede calcularse por la intersección con el eje x y V_{max}, con el eje *y*.

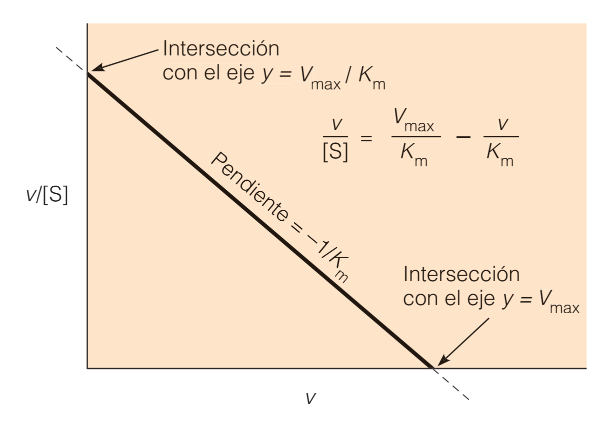


Figura 6.11 Representación de Eadie-Hofstee. La relación $v/[S]$ se representa como una función de v. K_m puede determinarse desde la pendiente y V_{max} por la intersección con el eje *x*.

Un ejemplo de determinación de K_m y V_{max}

Considere un ejemplo específico para determinar V_{max} y K_m, a partir de la representación doble recíproca, que implique a la enzima hexoquinasa, como se ilustra en las Figuras 6.12 y 6.13. La hexoquinasa es una enzima esencial en el metabolismo energético celular, porque cataliza la primera reacción de la glucolisis, la cual se discutirá en detalle en el Capítulo 9. La hexoquinasa cataliza la fosforilación de la glucosa en el átomo de carbono 6, usando ATP como fuente, tanto de fosfato, como de la energía necesaria para la reacción:

$$\text{Glucosa} + \text{ATP} \xrightarrow[\text{Hexoquinasa}]{} \text{Glucosa-6-fosfato} + \text{ADP} \qquad \textbf{(6.13)}$$

Para analizar cinéticamente esta reacción, debemos determinar la velocidad inicial en cada una de las diversas concentraciones de sustrato. Cuando una enzima tiene dos sustratos, el enfoque habitual es variar la concentración de un sustrato en un momento dado, mientras se mantiene la del otro constante, a un nivel suficientemente alto (cerca de la saturación), para asegurar que no llegue a ser un factor limitante de la velocidad. Debemos también tener cuidado de asegurarnos de que la determinación de la velocidad se haga antes de que el producto se acumule hasta los valores que hagan que la reacción contraria pueda tener lugar.

En el enfoque experimental que se muestra en la Figura 6.12, la glucosa es el sustrato variable, con el ATP presente a una concentración saturante en cada tubo. De las nueve reacciones de mezcla programadas para este experimento, una se toma como blanco (B), porque no contiene glucosa. Los otros ocho tubos tienen concentraciones graduales de glucosa que van desde 0,05 a 0,40 m*M*. Una vez

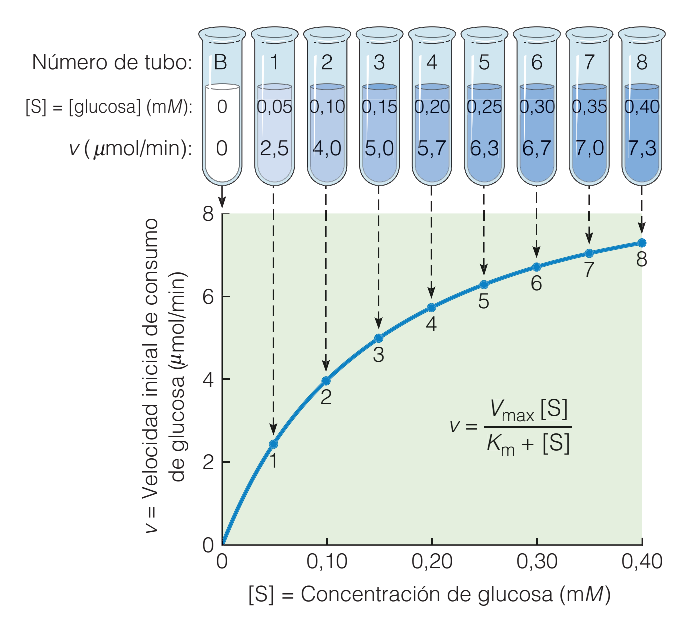


Figura 6.12 Estudio experimental de la cinética de la reacción de la hexoquinasa. Se incubó una serie de tubos de ensayo con concentraciones crecientes de glucosa y una concentración saturada de ATP, añadiendo una cantidad estándar de hexoquinasa. La velocidad inicial de la aparición del producto, *v*, se representó como una función de la concentración del sustrato [S]. La curva es hiperbólica, acercándose a V_{max}, a medida que la concentración de sustrato es cada vez mayor. Para la representación doble recíproca derivada de estos datos, *véase* la Figura 6.13.

preparados los tubos y mantenidos a una temperatura favorable (generalmente, 25 °C), se inicia la reacción, mediante la adición de una cantidad fija de hexoquinasa.

La velocidad de formación del producto se puede determinar, bien mediante monitorización espectofotométrica continua de la reacción de mezcla (suponiendo que uno de los reactivos o productos absorben luz de una determinada longitud de onda), bien permitiendo que cada reacción de mezcla progrese durante un periodo de tiempo corto y fijo, seguido de un ensayo químico de la desaparición del sustrato o de la acumulación del producto. En el caso de la reacción con hexoquinasa, se usa el último procedimiento, porque no hay manera de medir fotométricamente ni los productos ni los reactivos.

Como se indica en la Figura 6.12, la velocidad inicial para los tubos 1-8 osciló desde 2,5 a 7,3 μmol de glucosa consumida por minuto, sin reacción en el blanco. (Si la glucosa consumida hubiera sido detectada en el blanco, los valores del resto de los tubos tendrían que normarlizarse con relación a esta reacción no enzimática.) Cuando las velocidades de reacción se representan como una función de la concentración de glucosa, los ocho puntos generan la curva hiperbólica que se muestra en la Figura 6.12. Aunque los datos de la Figura 6.12 se han corregido para ilustrar mejor el ejemplo, lo cierto es que la mayoría de los datos cinéticos obtenidos por este método encajan bien en una curva hiperbólica, a menos que la enzima tenga algunas propiedades especiales que la alejen de la cinética de Michaelis-Menten.

La curva hiperbólica de la Figura 6.12 ilustra la necesidad de recurrir a un análisis lineal, porque no se pueden obtener, ni V_{max}, ni K_m, a partir de los valores de la representación hiperbólica, aunque se disponga de los datos para construir la curva. Sin embargo, la representación lineal doble recíproca de la Figura 6.13, sí lo permite. Para obtener los datos mostrados aquí, se calcularon los recíprocos de cada valor de [S] y *v* de la Figura 6.12. Así, los valores de [S] de 0,05-0,40 m*M*, generan recíprocos de 20-2,5 mM^{-1}, y los valores de *v* de 2,5-7,3 μmol/min, arrojan recíprocos de 0,4-0,14 min/μmol. Dado que son valores recíprocos, el dato del tubo 1 es el más alejado del origen, mientras que cada tubo sucesivo, alcanzará un valor más próximo al origen.

Cuando estos datos se van uniendo por medio de una línea recta, la intersección con el eje *y* coincide con el valor 0,1 min/mmol, y la del eje *x*, con $-6{,}7$ mM^{-1}. Desde estas intersecciones con los ejes, podemos calcular que $V_{max} = 1/0{,}1 = 10$ μmol/min y $K_m = -(1/-6{,}7) = 0{,}15$ m*M*. Si ahora volvemos a la representación de Michaelis-Menten de la Figura 6.12, podremos ver que ambos valores son razonables porque podemos imaginar fácilmente que la representación está creciendo hiperbólicamente hasta un máximo de 10 *m*mol/min. Más aún, la gráfica alcanza la mitad de su valor a una concentración de sustrato de 0,15

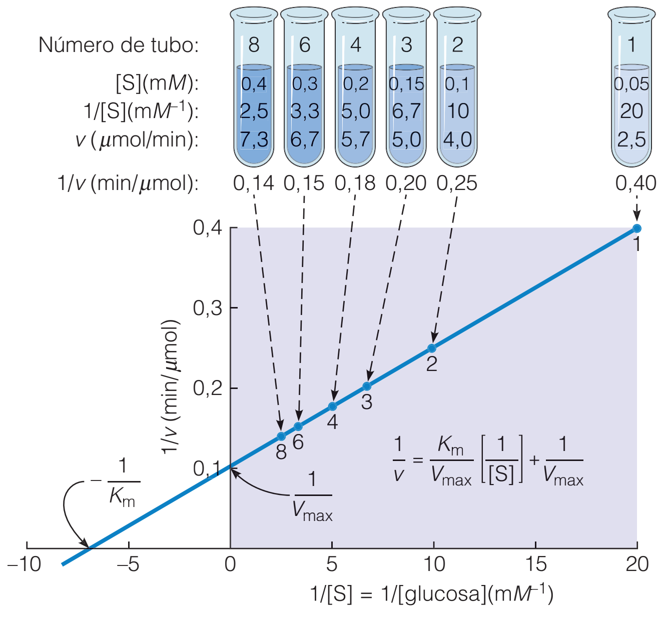


Figura 6.13 Representación doble recíproca de los datos de la hexoquinasa de la Figura 6.12. Los valores de 1/*v* y 1/[S] de cada tubo de ensayo se calcularon a partir de los datos de la Figura 6.12. Después se representó 1/*v* como función de 1/[S]. La intersección con el eje *y* en el punto 0,1, corresponde a $1/V_{max}$, por lo que V_{max} es 10 *m*mol/min. La intersección con el eje *x* en el valor $-6{,}7$, corresponde a $-1/K_m$, y así, K_m es 0,15 m*M*. (Note que, por falta de espacio, no se muestran aquí algunos de los tubos representados en la Figura 6.12.)

mM, que es el dato del tubo 3. Ésta es, por supuesto, la K_m de la hexoquinasa para la glucosa, generalmente escrita como $K_{m,\,glucosa}$.

Además, la enzima tiene una K_m para el otro sustrato, $K_{m,\,ATP}$, que se podría calcular variando la concentración de ATP mientras se mantiene la concentración de glucosa a un valor alto y fijo. Curiosamente, la hexoquinasa fosforila, no sólo a la glucosa, sino también a otras hexosas, teniendo un valor distinto para cada una. La K_m para fructosa, por ejemplo, es 1,5 mM, lo cual significa que necesita 10 veces más de fructosa que de glucosa, para mantener la reacción a la mitad de su velocidad máxima.

Aunque ligeramente simplificada e idealizada, esta es la manera en que los enzimólogos abordan el estudio de las reacciones catalizadas enzimáticamente. Sus análisis son a menudo más complicados y casi siempre precisan de un ordenador para calcular y trazar los datos dobles recíprocos y determinar los valores de K_m y de V_{max}, pero el enfoque básico es el mismo que el ilustrado en las Figuras 6.12 y 6.13.

Los inhibidores enzimáticos actúan irreversible o reversiblemente

Hasta aquí, hemos asumido que las únicas sustancias en las células que afectan a las actividades de las enzimas son sus sustratos. Sin embargo, las enzimas también están influidas por productos, sustratos alternativos, sustratos análogos, drogas, toxinas y una clase importante de reguladores llamados *efectores alostéricos*. Muchas de estas sustancias tienen un efecto inhibidor en la actividad enzimática, reduciendo (o incluso anulando) la velocidad de reacción con el sustrato deseado.

Esta **inhibición** de la actividad de la enzima es importante por varias razones. La primera y principal, es que la inhibición enzimática desempeña un papel vital como mecanismo de control en las células. Como discutiremos en el próximo apartado, muchas enzimas se someten a regulación por moléculas pequeñas específicas distintas de sus sustratos. La inhibición enzimática también es importante en la acción de drogas y toxinas, las cuales ejercen frecuentemente sus efectos inhibiendo enzimas específicas. Los inhibidores también son útiles para los enzimólogos como herramientas para el estudio de los mecanismos de reacción. Son especialmente importantes en este último caso, *los análogos de sustratos*, compuestos que se asemejan al sustrato real pero que son químicamente incapaces de llevar a cabo la reacción.

Los inhibidores pueden ser *reversibles o irreversibles.* Un **inhibidor irreversible** se une a la enzima convalentemente, causando una pérdida irrevocable de la actividad catalítica. No sorprende que los inhibidores irreversibles sean normalmente tóxicos para las células. Los iones de metales pesados son, a menudo, inhibidores irreversibles, al igual que suelen serlo los agentes alquilantes y los gases tóxicos nerviosos. Ésta es, de hecho, la razón de que muchos insecticidas y gases nerviosos sean tan tóxicos. Estas sustancias se unen irreversiblemente a la acetilcolinesterasa, una enzima que es fundamental para la transmisión del impuso nervioso (*véase* Capítulo 13). La inhibición de la actividad acetilcolinesterasa lleva a una parálisis rápida de las funciones vitales y, por tanto, a la muerte. Uno de tales gases nerviosos es el *di-isopropilo fluorofosfato*, el cual se une covalentemente al grupo hidroxilo de una serina crítica del sitio activo de la enzima, a la cual inactiva permanentemente.

Muchas toxinas naturales son también inhibidores enzimáticos irreversibles. Por ejemplo, el alcaloide *fisostigmina*, un componente del haba de Calabar (Nigeria), es tóxico para los animales porque inhibe irreversiblemente a la acetilcolinesterasa. El antibiótico *penicilina* es un inhibidor irreversible de las serín-enzimas implicadas en la síntesis de la pared celular bacteriana. La penicilina, por tanto, es eficaz en el tratamiento de infecciones bacterianas, porque impide la formación de las paredes celulares de bacterias.

Por contra, un **inhibidor reversible** se une a una enzima de forma disociable, no covalente, de manera que las formas libres y unidas del inhibidor existen en equilibrio las unas con las otras. Podemos representar tales uniones como

$$E + I \rightleftharpoons EI \qquad \textbf{(6.14)}$$

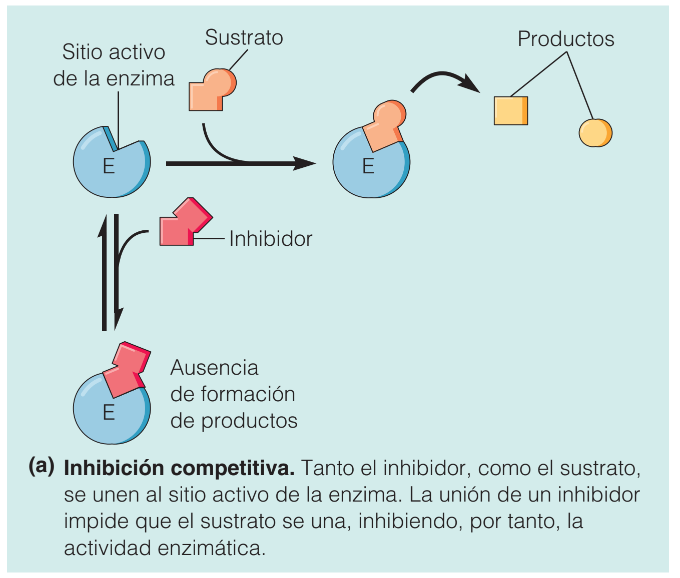
siendo E la enzima libre y activa, I el inhibidor, y EI el complejo inactivo enzima-inhibidor. Evidentemente, la fracción de la enzima que está disponible en la célula en forma activa, depende de la concentración del inhibidor y de la estabilidad del complejo enzima-inhibidor.

Las dos formas más comunes de inhibidores reversibles se clasifican como *inhibidores competitivos* e *inhibidores no competitivos.* Un inhibidor competitivo se une al sitio activo de la enzima y por lo tanto compite directamente con las moléculas de sustrato por el mismo sitio de la enzima (Figura 6.14a), reduciendo su actividad, hasta el punto de que los sitios activos de las moléculas de enzima pueden tener unidas, en cualquier momento, moléculas del inhibidor, en lugar de moléculas del sustrato.

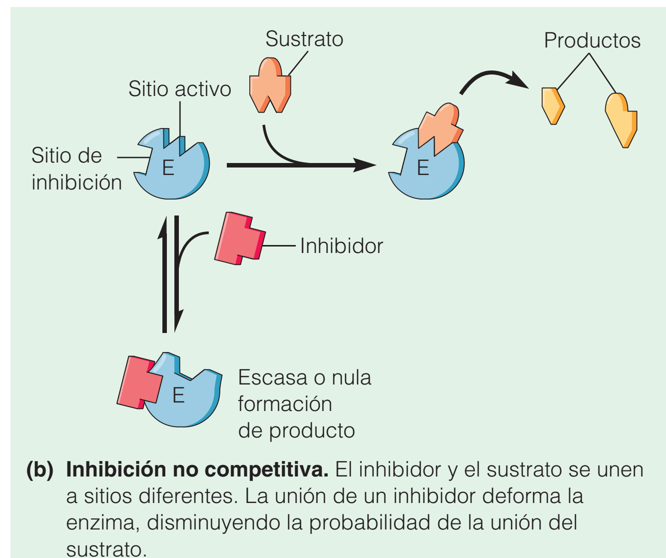
Un inhibidor no competitivo, por otro lado, se une a la superficie de la enzima en una posición diferente del sitio activo. Por tanto, no bloquea la unión del sustrato pero sin embargo inhibe la actividad de la enzima porque la unión del inhibidor con su sitio específico, reduce enormemente o incluso suprime la actividad catalítica en el sitio activo (Figura 6.14b)

Regulación enzimática

Para entender el papel de las enzimas en la función celular, debemos saber que es muy infrecuente, que la mejor opción para una célula, sea permitir funcionar a éstas a velocidades indiscriminadamente altas. En su lugar, las velocidades de las reacciones catalizadas enzimáticamente y las



(a) Inhibición competitiva. Tanto el inhibidor, como el sustrato, se unen al sitio activo de la enzima. La unión de un inhibidor impide que el sustrato se una, inhibiendo, por tanto, la actividad enzimática.



(b) Inhibición no competitiva. El inhibidor y el sustrato se unen a sitios diferentes. La unión de un inhibidor deforma la enzima, disminuyendo la probabilidad de la unión del sustrato.

Figura 6.14 Modos de acción de los inhibidores competitivos y no competitivos. Tanto los inhibidores competitivos (**a**), como los no competitivos (**b**) (en rojo) se unen reversiblemente a la enzima (E) inhibiendo, por tanto, su actividad. Los dos tipos de inhibidores difieren por el sitio de la enzima al que se unen.

rutas bioquímicas de las que forman parte, deben ajustarse continuamente, para mantenerlas sintonizadas, de forma precisa, con las necesidades de la célula. Un aspecto importante de ese ajuste reside en la capacidad de la célula de controlar las actividades de la enzima con especificidad y precisión.

Ya hemos visto una variedad de mecanismos reguladores, incluyendo cambios en las concentraciones de sustrato (y de producto), alteraciones en el pH, y la presencia de inhibidores. La regulación que depende directamente de las interacciones entre los sustratos y los productos con la enzima, se llama **regulación por el sustrato**. Tal y como se desprende de la ecuación de Michaelis-Menten, los incrementos en la concentración de sustrato tienen como resultado un aumento en la velocidad de reacción (*véase* Figura 6.8). Por el contrario, los incrementos en la concentración de producto reducen la velocidad a la cual el sustrato se convierte en producto. (Este efecto inhibidor de la concentración de producto es porque v tiene que ser identificado como la velocidad de reacción inicial en la ecuación de Michaelis-Menten, tal y como viene dado por la Ecuación 6.7. Si una cantidad significativa de producto está ya presente, o se acumula durante el curso de la reacción, la ecuación se vuelve más compleja que la forma simple en que la hemos considerado.)

La regulación por el sustrato es un importante mecanismo de control en las células, pero no es suficiente para la regulación de la mayoría de las reacciones o secuencias de reacciones. En la mayoría de las rutas, las enzimas se regulan también mediante otros mecanismos. Dos de los más importantes son la *regulación alostérica* y la *modificación covalente.* Estos mecanismos permiten a las células conectar o desconectar a las enzimas o ajustar sus velocidades de reacción, modulando apropiadamente las actividades de las enzimas.

Casi invariablemente, una enzima que se regula por tal mecanismo, cataliza el primer paso de una ruta de múltiples etapas. La secuencia completa se controla, incrementando o reduciendo la velocidad a la cual funciona la primera etapa. Entre las rutas que se regulan así, se encuentran las de ruptura de moléculas grandes (como azúcares, grasas o aminoácidos) y las que conducen a la síntesis de sustancias necesarias para la célula (como aminoácidos y nucleótidos). Ahora discutiremos la regulación alostérica y la modificación covalente de una manera introductoria, con la intención de volver a estos mecanismos a medida que encontremos ejemplos específicos en capítulos posteriores.

Las enzimas alostéricas se regulan por moléculas diferentes de los reactivos y los productos

La *regulación alostérica* es el único mecanismo importante de control, por el cual la tasa de las reacciones catalizadas enzimáticamente, se ajusta a las necesidades celulares. Para entender este modo de regulación, considere la vía por la cual una célula convierte un precursor A en un producto final P, mediante una serie de intermediarios B, C y D, en una secuencia de reacciones catalizadas respectivamente, por las enzimas E_1, E_2, E_3 y E_4:

$$A \xrightarrow[E_1]{} B \xrightarrow[E_2]{} C \xrightarrow[E_3]{} D \xrightarrow[E_4]{} P \qquad \textbf{(6.15)}$$

El producto P podría ser, por ejemplo, un aminoácido que la célula necesita para la síntesis de proteínas, y A po-

dría ser algún componente celular común que sirve como punto de partida para la secuencia de reacción específica que conduce a P.

Retroinhibición. Si se permite progresar constantemente a la ruta 6-15, con una tasa no limitada, se convertirán grandes cantidades de A en P, con los posibles efectos adversos de la reducción de A o una excesiva acumulación de P (o ambos). Está claro que los intereses celulares quedan mejor satisfechos cuando la ruta no está funcionando a su máxima velocidad o incluso a una velocidad constante, sino a una velocidad, cuidadosamente determinada por la necesidad de P. De alguna manera, las enzimas de esta vía deben ser sensibles al nivel celular del producto P, al igual que una caldera necesita ser sensible a la temperatura de las habitaciones que pretende calentar. En el último caso, un termostato proporciona el vínculo regulador necesario entre la caldera y su «producto», el calor. En nuestro ejemplo de la enzima, la regulación deseada es posible porque el producto P es un inhibidor específico de E_1, la enzima que cataliza la primera reacción de la secuencia.

Este fenómeno es llamado **retroinhibición** (o **inhibición por el producto final**) y se representa por la flecha de líneas discontinuas que conecta el producto P con la enzima E_1, en la siguiente vía:

$$A \xrightarrow[E_1]{} B \xrightarrow[E_2]{} C \xrightarrow[E_3]{} D \xrightarrow[E_4]{} P \qquad \textbf{(6.16)}$$

Retroinhibición de E1 mediante P

De manera más general, una retroinhibición sucede cada vez que un producto metabólico inhibe a una de las enzimas implicada en la vía por la cual ese producto se sintetiza. La retroinhibición es uno de los mecanismos más comúnmente usados por las células para asegurar que las actividades de las secuencias de reacción se ajustan a las necesidades celulares.

La Figura 6.15 proporciona un ejemplo específico de tal secuencia —la ruta de cinco pasos en la que el aminoácido *isoleucina* se sintetiza a partir del aminoácido treonina—. En este caso, la primera enzima en la vía, la treonina desaminasa, se regula mediante la concentración de isoleucina en la célula. Si se está consumiendo isoleucina (por ejemplo, en la síntesis de proteínas), su concentración será baja. En estas condiciones, la treonina desaminasa está activa y la vía funciona para producir más isoleucina, de manera que se satisface la necesidad real de este aminoácido. Si los requerimientos de isoleucina decrecen, ésta empezará a acumularse en la célula y el incremento de su concentración conducirá a una reducción de la actividad de la treonina desaminasa y, por ende, de la velocidad de síntesis del aminoácido.

Regulación alostérica. ¿Cómo puede la primera enzima en una vía (por ejemplo, la enzima E_1 en la secuencia de Reacción 6.16) ser sensible a la concentración de una sustancia P que no es ni su sustrato ni su producto inmediato? O, volviendo a la Figura 6.15, ¿cómo puede la actividad de la treonina desaminasa ser sensible a la concentración de isoleucina, cuando su estructura difiere tanto de la de la treonina, que es improbable que sea reconocida por el centro activo de la treonina deaminasa?

Esta pregunta fue respondida por primera vez en 1963 por Jacques Monod, Jean-Pierre Changeux y François Ja-

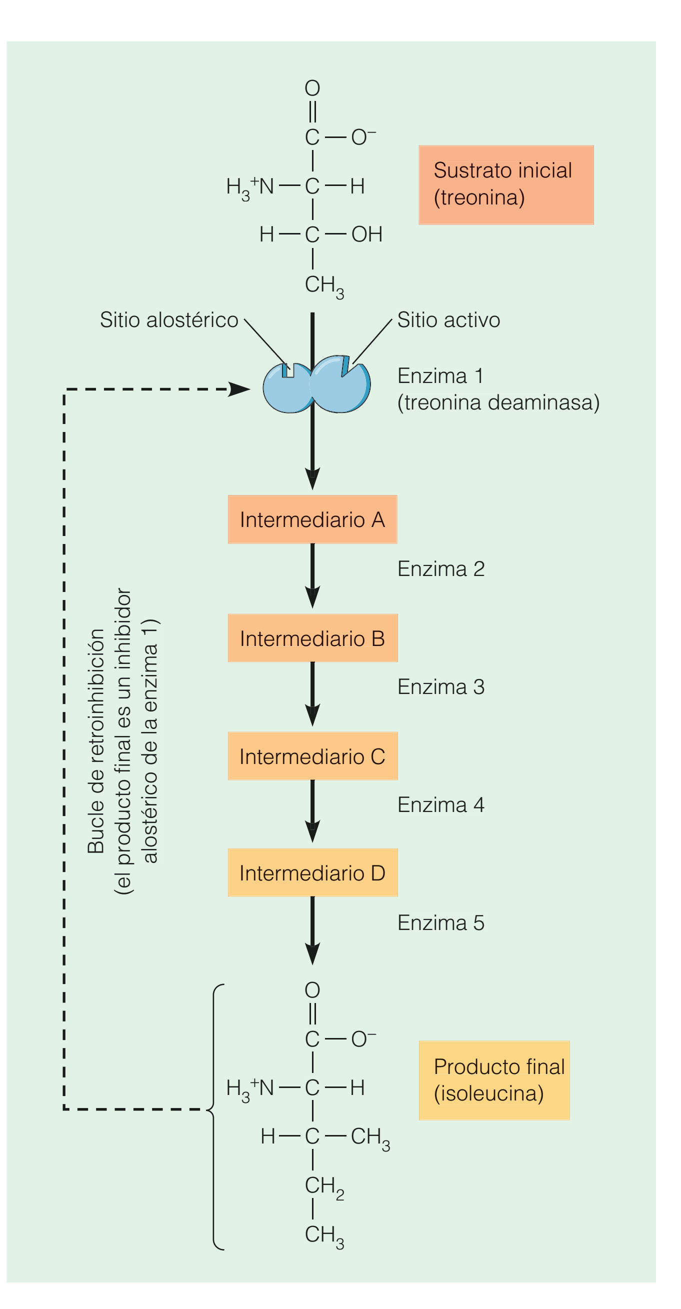


Figura 6.15 Regulación alostérica de la actividad enzimática. La ruta de síntesis del aminoácido isoleucina a partir de treonina, es un buen ejemplo de retroinhibición. La primera enzima de la secuencia, la treonina deaminasa, es inhibida alostéricamente por la isoleucina, la cual se une a la enzima en un sitio *diferente* del sitio activo.

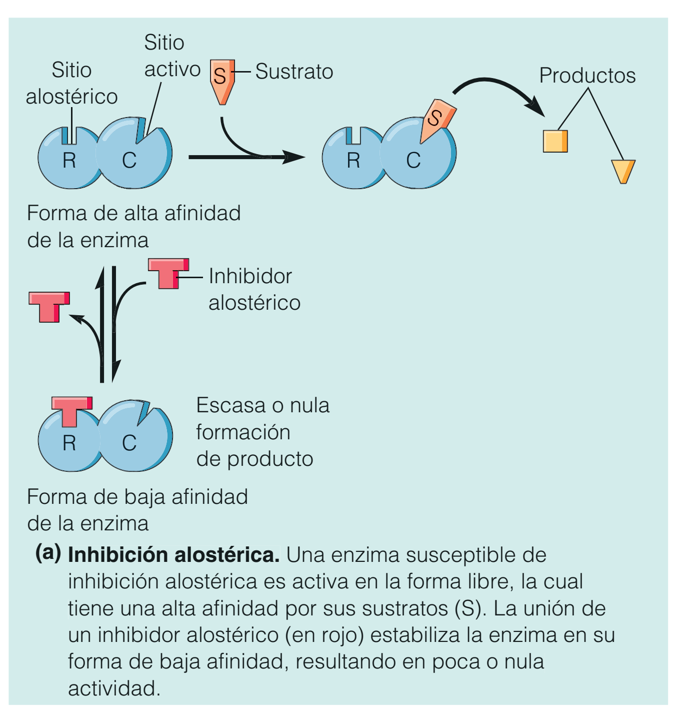
cob. Aunque basada inicialmente en datos incompletos, su modelo fue rápidamente tenido en consideración y se desarrolló hasta llegar a ser la base de nuestro entendimiento de la **regulación alostérica**. El término *alostérico* deriva del griego «otra forma (o estado)», indicando, por lo tanto, que todas las enzimas con capacidad de regulación alostérica, pueden existir en dos estados diferentes. En una de las dos formas, la enzima tiene una afinidad alta por su(s) sustrato(s), mientras que en la otra, tiene poca o ninguna afinidad. Las enzimas con esta propiedad se llaman **enzimas alostéricas**. Las dos formas diferentes de una enzima alostérica son fácilmente interconvertibles y están de hecho, en equilibrio una con otra. Obviamente, la velocidad de reacción es alta cuando la enzima está en la forma de alta afinidad y baja, o incluso nula, cuando la enzima está en su forma de baja afinidad.

El que se favorezca la forma activa o inactiva de una enzima alostérica depende de la concentración celular de la sustancia reguladora apropiada, llamada **efector alostérico**. En el caso de la síntesis de isoleucina, la enzima alostérica es la treonina desaminasa y el efector alostérico es la isoleucina. De manera más general, *un efector alostérico es una pequeña molécula orgánica que regula la actividad de una enzima, para la cual no es ni el sustrato, ni el producto inmediato.*

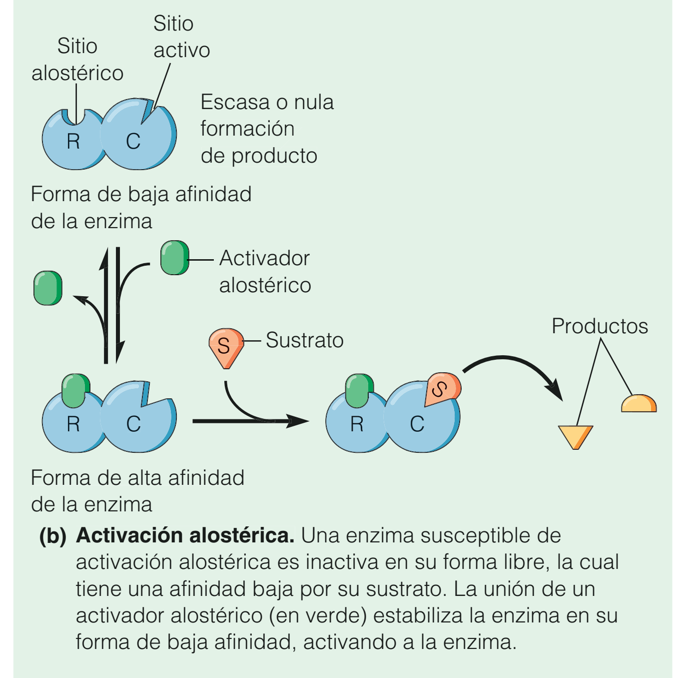
Un efector alostérico influye en la actividad de la enzima uniéndose a una de las dos formas interconvertibles de ésta, estabilizándola en ese estado. En otras palabras, una enzima alostérica puede existir en una forma compleja o simple, dependiendo de si tiene una molécula efectora unida a ella o no. El efector se une a la enzima debido a la presencia en la superficie de ésta de un **sitio alostérico** (o **regulador**), que es distinto del sitio activo en el cual tiene lugar el evento catalítico. Así, una característica distintiva de todas las enzimas alostéricas (y otras proteínas alostéricas) es la presencia en la enzima de un *sitio activo* al que se une el sustrato y un *sitio alostérico* al que se une el efector. De hecho, algunas enzimas alostéricas tienen múltiples sitios alostéricos, cada uno capaz de reconocer un efector diferente.

Un efector puede ser, o bien un **inhibidor alostérico** o bien un **activador alostérico**, dependiendo del efecto que ejerza cuando se una al sitio alostérico de la enzima, es decir, dependiendo de si la forma compleja es el estado de baja afinidad o alta afinidad de la enzima (Figura 6.16). La unión de un inhibidor alostérico cambia el equilibrio entre las dos formas de la enzima para favorecer el estado de baja afinidad (Figura 6.16a). La unión de una activador alostérico, por otra parte, cambia el equilibrio a favor del estado de alta afinidad (Figura 6.16b). En cada caso, la unión del efector al sitio alostérico estabiliza la enzima en una de sus dos formas, incrementando o disminuyendo de ese modo la probabilidad de unión al sustrato.

La mayoría de las enzimas alostéricas son proteínas grandes, multiméricas y con un sitio activo o un sitio alostérico en cada subunidad. De hecho, los sitios activos y los



(a) Inhibición alostérica. Una enzima susceptible de inhibición alostérica es activa en la forma libre, la cual tiene una alta afinidad por sus sustratos (S). La unión de un inhibidor alostérico (en rojo) estabiliza la enzima en su forma de baja afinidad, resultando en poca o nula actividad.



(b) Activación alostérica. Una enzima susceptible de activación alostérica es inactiva en su forma libre, la cual tiene una afinidad baja por su sustrato. La unión de un activador alostérico (en verde) estabiliza la enzima en su forma de baja afinidad, activando a la enzima.

Figura 6.16 Mecanismos de inhibición o activación alostéricas. Una enzima alostérica está constituida por una o más subunidades catalíticas (C) y una o más subunidades reguladoras (R), cada una de las cuales con un sitio activo y un sitio alostérico, respectivamente. La enzima existe en dos formas, una con alta afinidad por el sustrato (y, por tanto, con una probabilidad alta de formación de producto) y otra con una baja afinidad (y la correspondiente probabilidad baja de formación de producto). La forma que adquiere una enzima es dependiente de la concentración del efector(es) alostérico(s) para esa enzima.

sitios alostéricos están normalmente en diferentes subunidades de la proteína, a las que denominamos **subunidades catalíticas** y **subunidades reguladoras**, respectivamente (fíjese en las subunidades C y R de las moléculas de la enzima que se muestran en la Figura 6.16). Esto significa, consecuentemente, que la unión de las moléculas efectoras a los sitios alostéricos, no sólo afecta a la forma de las subunidades reguladoras, sino también a las subunidades catalíticas.

Las enzimas alostéricas manifiestan interacciones cooperativas entre subunidades

Muchas enzimas alostéricas poseen una propiedad conocida como **cooperatividad**. Esto significa que, a medida que los múltiples sitios catalíticos unen moléculas de sustrato, la enzima sufre cambios conformacionales, que afectan a la afinidad de los restantes sitios de unión del sustrato. Algunas enzimas muestran *cooperatividad positiva*, en la cual la unión de una molécula sustrato a una subunidad catalítica incrementa la afinidad de otras subunidades catalíticas por el sustrato. Otras enzimas muestran *cooperativad negativa*, en la cual el sustrato unido a una subunidad catalítica reduce la afinidad de otros sitios catalíticos por el sustrato.

El efecto cooperativo permite a las células producir enzimas que son más o menos sensibles a los cambios en la concentración de sustrato, lo que por otra parte, sería predecible por la cinética de Michaelis-Menten. La cooperatividad positiva hace que la actividad catalítica de la enzima se incremente más rápido de lo normal a medida que la concentración del sustrato aumenta, mientras que la cooperatividad negativa significa que la actividad enzimática aumenta más lentamente de lo esperado.

Las enzimas también se pueden regular por la adición o eliminación de grupos químicos

Muchas enzimas, además de la regulación alostérica, están sometidas a control mediante modificaciones covalentes. En esta manera de regulación, la actividad de una enzima se ve afectada por la adición o eliminación de grupos químicos específicos. Las modificaciones comunes incluyen la adición de grupos fosfato, grupos metilo, grupos acetilo, o derivados de nucleótidos. Algunas de estas modificaciones pueden ser reversibles, mientras que otras no. En cada caso, el efecto de la modificación es la activación o la inactivación de la enzima, o por lo menos la modulación, hacia arriba o hacia abajo, de su actividad.

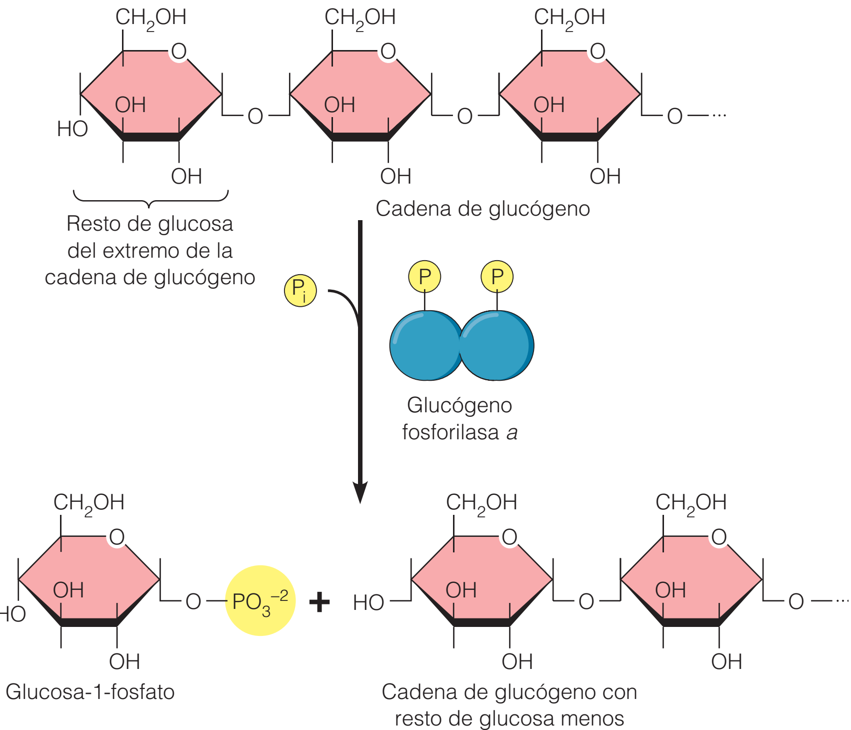
Fosforilación/defosforilación. La adición reversible de grupos fosfato es una de las modificaciones más frecuentes y mejor entendidas. La adición de grupos fosfato, es decir, la **fosforilación** suele producirse por transferencia de un grupo fosfato desde el ATP al grupo hidroxilo de un residuo de serina, treonina o tirosina de la proteína enzimática. Las enzimas que catalizan la fosforilación de otras enzimas (o de otras proteínas) se llaman **proteín-quinasas**. El proceso inverso, la **defosforilación**, está catalizado por enzimas llamadas **proteín-fosfatasas** e implica la eliminación de un grupo fosfato desde la proteína fosforilada.

Esta forma de regulación es la de la *glucógeno fosforilasa*, una enzima que se encuentra en las células musculares esqueléticas (Figura 6.17). La enzima hidroliza el glucógeno por eliminaciones sucesivas de unidades de glucosa, en forma de glucosa-1-fosfato (Figura 6.17a). La regulación de esta enzima dimérica se consigue en parte por la presencia en las células musculares de dos formas interconvertibles de la enzima, una forma activa llamada *fosforilasa a* y otra inactiva, llamada *fosforilasa b* (Figura 6.17b). Cuando se necesita hidrolizar glucógeno en las células musculares, la forma inactiva *b* de la enzima pasa a la forma activa *a*, por adición de un grupo fosfato en una serina específica, en cada una de las dos subunidades de la fosforilasa. Esta reacción se cataliza por *la fosforilasa quinasa* y el resultado es un cambio conformacional en la fosforilasa. Cuando no se necesita hidrolizar más glucógeno, los grupos fosfato la fosforilasa *a* son eliminados por la enzima *fosforilasa fosfatasa*. (La *glucógeno sintasa*, la enzima que añade nuevas unidades de glucosa a la cadena de glucógeno, responde de forma opuesta; es inactiva en la forma fosforilada y se activa por defosforilación.)

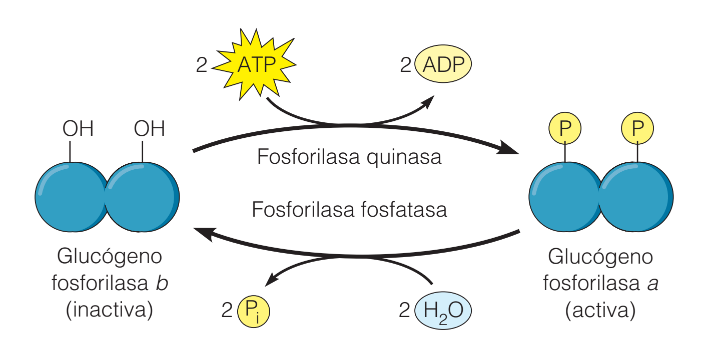
Además de la regulación por los mecanismos de fosforilación/defosforilación de la Figura 6.17, la glucógeno fosforilasa es también una enzima alostérica, que se inhibe por glucosa y ATP, y se activa por AMP. Si una señal hormonal provoca la fosforilación y, por tanto, activación de la fosforilasa en una célula muscular, que aún posee suficiente de glucosa, ésta inhibirá alostéricamente a la enzima, hasta que sea realmente necesaria. Por otra parte, las células musculares que tengan niveles bajos de glucosa, podrán beneficiarse inmediatamente de la conversión de la fosforilasa a la forma activa.

La existencia de dos niveles de regulación para la glucógeno fosforilasa, ilustra un aspecto importante de la regulación enzimática. Muchas enzimas se controlan por dos o más mecanismos reguladores, y de ese modo, permiten a la célula responder adecuadamente frente a varias situaciones.

Ruptura proteolítica. Un tipo diferente de activación covalente de enzimas consiste en la eliminación irreversible de un fragmento de la cadena polipeptídica, mediante una enzima proteolítica (que degrada proteínas) adecuada. Este tipo de modificación, llamado **ruptura proteolítica**, es el que tiene lugar en las enzimas proteolíticas del páncreas, tripsina, quimiotripsina y carboxipeptidasa. Estas enzimas, sintetizadas en el páncreas, son secretadas al duodeno, en respuesta a una señal hormonal. Estas proteasas, junto con la pepsina del estómago y otras enzimas proteolíticas secretadas por las células del intestino, pueden digerir casi todas las proteínas ingeridas, rindiendo aminoácidos libres, que se pueden absorber por las células epiteliales del intestino.



(a) Reacción catalizada por la glucógeno fosforilasa



(b) Regulación de la glucógeno fosforilasa

Figura 6.17 Regulación de la glucógeno fosforilasa por fosforilación. (**a**) La glucógeno fosforilasa es una enzima dimérica en las células musculares, que libera unidades de glucosa a partir del glucógeno, en forma de glucosa-1 fosfato, utilizable por la célula muscular, como fuente de energía. (**b**) La glucógeno fosforilasa está regulada, en parte, por un mecanismo de fosforilación/defosforilación. La forma inactiva de la enzima, la fosforilasa *b*, puede ser convertida a la forma activa, fosforilasa *a*, por la transferencia de grupos fosfato desde el ATP a una serina determinada, en cada una de las dos subunidades de la enzima. La reacción de fosforilación es catalizada por la enzima fosforilasa quinasa. La eliminación de los grupos fosfato por la fosforilasa fosfatasa, devuelve a la fosforilasa a la forma *b* inactiva.

Las proteasas pancreáticas no son sintetizadas en su forma activa; probablemente eso podría causar problemas en las células del páncreas, la cuales deben protegerse de sus propias enzimas proteolíticas. En cambio, cada una de estas enzimas se sintetiza como una molécula ligeramente más grande y catalíticamente inactiva llamada *zimógeno.* Los zimógenos deben autodigerirse proteolíticamente para producir las enzimas activas. Varios de estos acontecimientos se muestran en la Figura 6.18. Por ejemplo, la tripsina se sintetiza inicialmente como un zimógeno llamado tripsinógeno. Cuando el tripsinógeno alcanza el duodeno, se activa por la eliminación de un hexapéptido (una cadena de seis aminoácidos) desde su extremo N-terminal, por la acción de la *enteroquinasa*, una proteasa de membrana, producida por las células del duodeno. La tripsina activa luego a los otros zimógenos, mediante proteolisis específicas.

Ribozimas: moléculas de RNA con actividad enzimática

Antes de los primeros años de la década de 1980, se pensaba que todas las enzimas eran proteínas. De hecho, esa afirmación se consideró como una de las verdades fundamentales de la biología celular y se encontraba en todos los libros de texto. Los biólogos celulares llegaron a estar convencidos de que todas las enzimas eran proteínas, porque todas las enzimas aisladas en los 55 años que siguieron a la purificación de la ureasa por Sumner en 1926, resultaron ser proteínas. Pero la biología está llena de sorpresas, y ahora sabemos que la afirmación necesita ser revisada, para incluir a los catalizadores constituidos por ARN y denominados **ribozimas**.

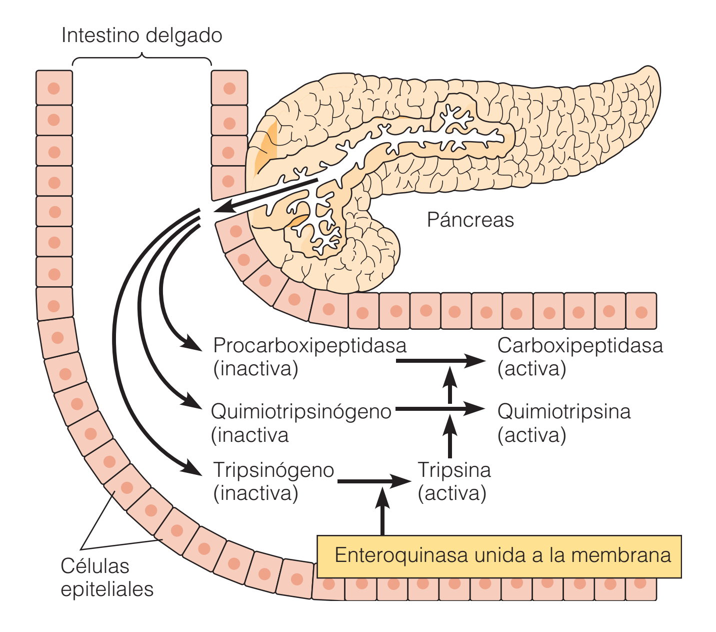


Figura 6.18 Activación de los zimógenos pancreáticos por proteolisis. Las proteasas pancreáticas son sintetizadas y secretadas en el intestino delgado, como precursores inactivos llamados zimógenos. La procarboxipeptidasa, el tripsinógeno y el quimiotripsinógeno son zimógenos. La activación del tripsinógeno a tripsina requiere la eliminación de un segmento hexapeptídico por la enteroquinasa, una enzima duodenal de membrana. La tripsina activa luego a otros zimógenos, por ruptura proteolítica. La procarboxipeptidasa es activada en una proteolisis única, mientras que la activación de quimiotripsinógeno es un proceso algo más complicado, en dos etapas, cuyos detalles no se muestran aquí.

La primera evidencia llegó en 1981, cuando Thomas Cech y sus colegas de la Universidad de Colorado descubrieron una excepción aparente a la regla «todas las enzimas son proteínas». Estaban estudiando el ayuste[1] de un segmento interno de un precursor de un RNA específico (pre-rRNA) in *Tetrahymena thermophila*, un organismo eucariota unicelular. (Como veremos en el Capítulo 21, muchos de los RNAs de eucariotas requieren que se eliminen uno o más segmentos internos llamados intrones, antes de que lleguen a ser funcionales en la célula. El proceso de corte implica la escisión del intrón y la unión de las dos partes de la molécula original en el sitio de escisión.) En el curso de su trabajo, los investigadores hicieron la observación notable de que el proceso ¡aparentemente avanzaba sin la presencia de proteínas! Describiendo su intento de estudiar la escisión de intrones in vitro, Ceah escribió:

Resultó que algunas de las moléculas pequeñas —principalmente iones de magnesio y varias formas del nucleótido guanosina— eran necesarias para que tuviera lugar la reacción. Para nuestra sorpresa, no era necesario el extracto nuclear que contenía las enzimas. Nos vimos obligados a concluir que, o la actividad enzimática provenía de una proteína unida tan estrechamente al RNA que éramos incapaces de separarla de él, o que el RNA estaba catalizando su propio ayuste. Dado lo arraigada que estaba la idea de que todos los catalizadores biológicos eran proteínas, la hipótesis de la catálisis por RNA no era fácil de aceptar.

Pese a todo, los experimentos adicionales apuntaron hacia la conclusión inicial: la eliminación de un intrón de 413-nucleótidos del pre-rRNA de *Tetrahymena* está catalizada por la propia molécula de pre-rRNA, siendo, por tanto, un ejemplo de *autocatalisis.*

La Figura 6.19 muestra el proceso de escisión, el cual implica ① el plegamiento de la molécula de pre-RNAr no ayustada para formar un bucle, ② el ataque por un grupo hidroxilo de una de guanosina que actúa como cofactor, ③ corte y ayuste de la molécula de rRNA con la liberación del intrón, y ④ rotura adicional autocatalítica del intrón para la eliminación de 19 nucleótidos más. El intrón completamente procesado es una ribozima, capaz de acortar o alargar oligonucleótidos pequeños.

Se podría argumentar que la molécula de rRNA de la Figura 6.19 no satisface la definición de catalizador, que supone que el propio catalizador no se debe alterar durante el proceso de reacción. Sin embargo, dos años más tarde se descubrió otro catalizador constituido por RNA en el laboratorio de Sydney Altman en la Universidad de Yale, que supera esta restricción. La enzima, llamada *ribonucleasa P*, rompe precursores de RNA de transferencia (pre-tRNAs) para producir moléculas de RNA funcionales. (En este caso, se elimina un segmento terminal de la molécula de RNA, en lugar de un intrón, como ocurría en el procesamiento del pre-rRNA.)

Se sabía desde hacía tiempo que la ribonucleasa P tenía un componente proteico y otro de RNA, y se suponía que el sitio activo estaba en el componente proteico. Sin embargo, Altman y sus colaboradores demostraron inequívocamente, mediante el aislamiento de los componentes y su estudio por separado, que el componente proteico aislado era completamente inactivo, mientras que el componente ribonucleotídico sí era capaz de catalizar la ruptura específica de los precursores del tRNA y, además, no se alteraba durante el proceso. Además, la reacción catalizada mediante RNA seguía la cinética de Michaelis-Menten, una evidencia más de que era el RNA quien estaba actuando como una auténtica enzima. (El componente proteico aumenta la actividad pero no es necesario para la unión del sustrato o su ruptura.)

La trascendencia de estos hallazgos se reconoció con el Premio Nobel que Cech y Altman compartieron en 1989 por sus descubrimientos de las ribozimas. A partir de estos descubrimientos iniciales, se han descrito más ejemplos de

[1] *N. del T.:* siguiendo la recomendación de Biólogos Moleculares hispanohablantes, traduciremos como *ayuste* el término inglés *splicing*, que hace referencia al procesamiento del RNA, consistente en el corte y empalme de ciertos sectores del mismo. Según el DRAE, ayuste es un término náutico que refiere a la «costura o unión de dos cabos».

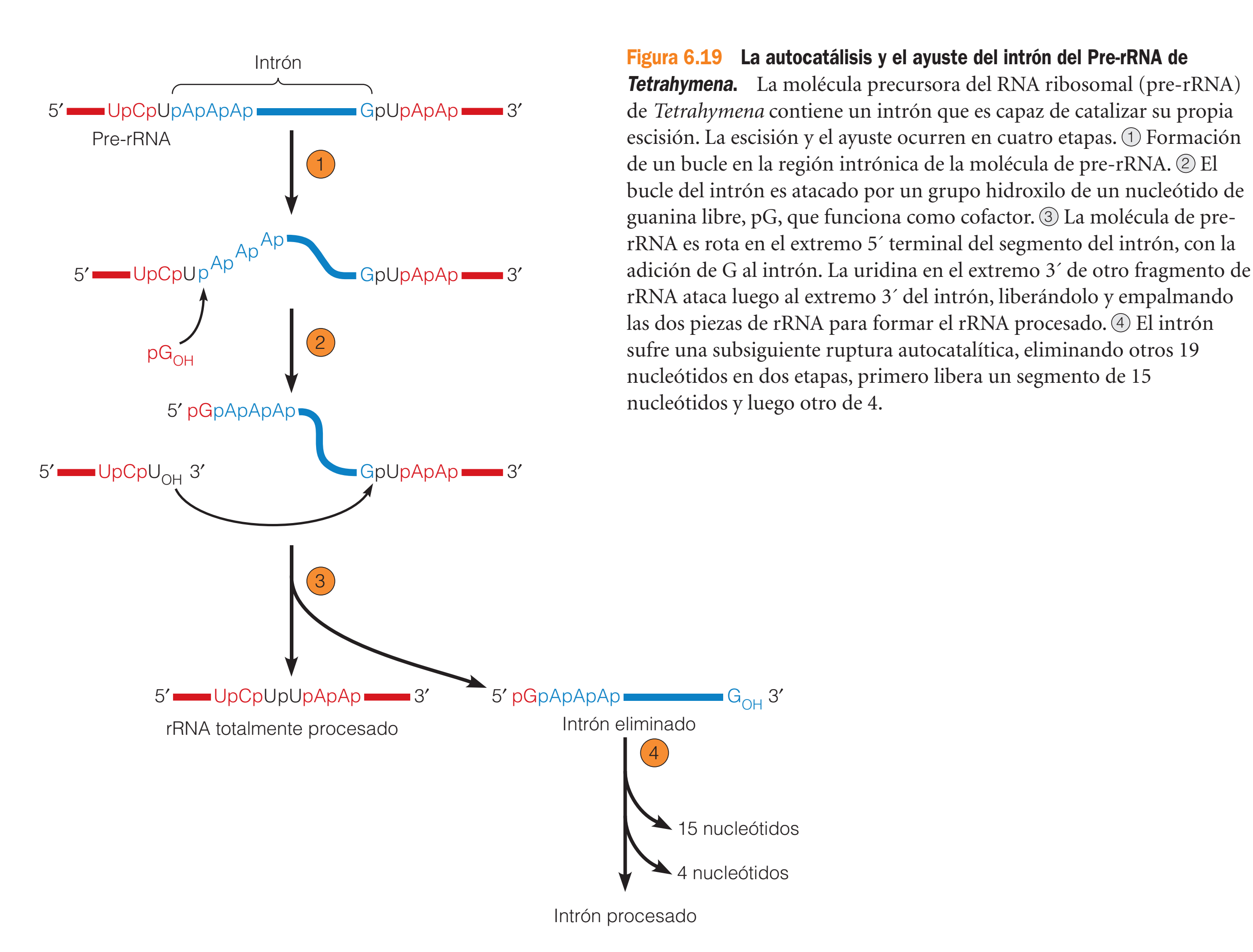


Figura 6.19 La autocatálisis y el ayuste del intrón del Pre-rRNA de *Tetrahymena*. La molécula precursora del RNA ribosomal (pre-rRNA) de *Tetrahymena* contiene un intrón que es capaz de catalizar su propia escisión. La escisión y el ayuste ocurren en cuatro etapas. ① Formación de un bucle en la región intrónica de la molécula de pre-rRNA. ② El bucle del intrón es atacado por un grupo hidroxilo de un nucleótido de guanina libre, pG, que funciona como cofactor. ③ La molécula de pre-rRNA es rota en el extremo 5´ terminal del segmento del intrón, con la adición de G al intrón. La uridina en el extremo 3´ de otro fragmento de rRNA ataca luego al extremo 3´ del intrón, liberándolo y empalmando las dos piezas de rRNA para formar el rRNA procesado. ④ El intrón sufre una subsiguiente ruptura autocatalítica, eliminando otros 19 nucleótidos en dos etapas, primero libera un segmento de 15 nucleótidos y luego otro de 4.

ribozimas. De especial relevancia es el ejemplo de un paso esencial en la síntesis de proteínas en los ribosomas. Éstos pueden ser considerados como enzimas muy grandes, que catalizan la formación de los enlaces peptídicos, añadiendo aminoácidos a una cadena polipeptídica creciente (*véase* Figura 4.8). Más específicamente, la subunidad ribosomal grande es el lugar de la actividad peptidil transferasa, que cataliza la formación del enlace peptídico.

Durante mucho tiempo se ha supuesto que el sitio activo de la peptidil transferasa estaba localizado en una de las moléculas proteicas de la subunidad grande. Sin embargo, Harry Noller y sus colaboradores de la Universidad de Santa Cruz en California, centraron su atención en una de las moléculas de rRNA. Este trabajo les llevó a la demostración, publicada en 1992, de que a pesar de la eliminación de por lo menos el 95% de la proteína de la subunidad ribosomal grande de una bacteria, el rRNA mantenía intacta el 80% de la actividad peptidil transferasa de la subunidad. Además, la actividad desaparecía por el tratamiento con ribonucleasa, una enzima que degrada RNA, pero no se afectaba por proteinasa K, una enzima que degrada proteínas (de hecho, ésta fue uno de los agentes usados para eliminar las proteínas de la subunidad). Así pues, quedó demostrado que la actividad peptidil transferasa, responsable de un paso crucial en la síntesis de proteínas, es una ribozima.

Aunque muchos biólogos se quedaron inicialmente asombrados por el descubrimiento de las ribozomas, no hay razón para pensar que las moléculas de RNA no puedan ser capaces de funcionar como enzimas. Al igual que las proteínas, las moléculas de RNA pueden adoptar una estructura terciaria compleja, que es la condición previa para la función catalizadora en ambos casos.

El descubrimiento de las ribozomas ha cambiado considerablemente la manera de pensar sobre el origen de la vida en la tierra. Durante muchos años, los científicos habían pensado que las primeras macromoléculas catalizadoras debían haber sido polímeros de aminoácidos, semejantes a las proteínas. Sin embargo, esta suposición choca con la dificultad de que no hay una forma sencilla de explicar cómo una proteína primitiva puede portar información o replicarse por sí misma, que son dos atributos vitales básicos. Sin embargo, si el primer catalizador fuera RNA en vez de moléculas proteicas, es conceptualmente más fácil de asumir un sistema de moléculas de RNA que actúe sirviendo, tanto a la catálisis, como a la replicación, pudiendo transferir la información a otras generaciones.

Perspectiva

Cerrando el círculo, volvemos al tema planteado en la introducción de este capítulo —a saber, que la termodinámica nos permite valorar la factibilidad de una reacción, pero no dice nada sobre la probabilidad de que esa reacción ocurra realmente en la célula, a una velocidad apreciable—. Se requiere un catalizador, que siempre es una enzima en los sistemas biológicos, para asegurar que se cumplen los requerimientos de energía de activación y que se alcanza el estado de transición. Todas las enzimas proteicas son polímeros de aminoácidos con una secuencia programada genéticamente, y son sensibles a la temperatura y el pH. También son exquisitamente específicas, para un único sustrato o para un conjunto de compuestos estrechamente relacionados. El proceso catalítico tiene lugar en el sitio activo, un grupo crítico de aminoácidos responsables de la unión y la activación del sustrato y de la auténtica reacción química. La unión de un sustrato apropiado en el sitio de activo, induce un acoplamiento más eficaz entre la enzima y el sustrato, facilitando de ese modo la activación del sustrato.

Las reacciones catalizadas enzimáticamente tienen lugar a través de un intermediario enzima-sustrato. Muchas enzimas siguen la cinética de Michaelis-Menten, caracterizada por una relación hiperbólica entre la velocidad de reacción inicial v y la concentración del sustrato [S]. El límite superior de la velocidad se denomina V_{max}, y la concentración de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima, se expresa como la constante de Michaelis, K_m. La relación hiperbólica entre v y [S] se puede convertir en lineal, mediante una ecuación doble recíproca, en la que V_{max} y K_m se pueden determinar gráficamente o analizar en un ordenador.

La actividad enzimática está influida, no sólo por la disponibilidad del sustrato, sino también por los productos, sustratos alternativos, sustratos análogos, drogas y toxinas, muchas de las cuales tienen un efecto inhibidor. La inhibición puede ser reversible o irreversible, implicando estas últimas la formación de uniones covalentes del inhibidor a la superficie de la enzima. Por otra parte, un inhibidor reversible se une a la enzima de forma reversible, ya sea en el sitio activo (inhibición competitiva) o en otro lugar de la superficie de la enzima (inhibición no competitiva).

Las enzimas se pueden regular para ajustar sus niveles de actividad a las necesidades de la célula. La regulación por el sustrato se basa en los efectos que tienen las concentraciones del sustrato y de los productos, en la velocidad de reacción. Los mecanismos de control adicionales incluyen la regulación alostérica y las modificaciones covalentes. La mayoría de las enzimas reguladas alostéricamente catalizan el primer paso en una secuencia de reacciones y son proteínas multiméricas con varias subunidades catalíticas y varias subunidades reguladoras. Cada una de la subunidades catalíticas tiene un sitio activo que reconoce a los sustratos y a los productos, mientras que cada subunidad reguladora tiene uno o más sitios alostéricos, que reconocen a las moléculas efectoras específicas. Un determinado efector puede inhibir o activar la enzima, dependiendo de cuál de las formas de la enzima esté favorecida por la unión del efector. Las modificaciones covalentes más comunes son la fosforilación y la desfosforilación, como ocurre, por ejemplo en la glucógeno fosforilasa, y la ruptura proteolítica, como ocurre en la activación de los zimógenos de las enzimas proteolíticas secretadas por el páncreas.

Aunque durante mucho tiempo se pensó que todas las enzimas eran proteínas, ahora reconocemos las propiedades catalizadoras de ciertas moléculas de RNA llamadas ribozimas. Éstas incluyen algunas moléculas de rRNA, que son capaces de catalizar la eliminación de sus propios intrones, de eliminar los componentes RNA de enzimas ribonucleoproteicas y quizás incluso parte del RNA de ribosomas ya ensamblados. El descubrimiento de las ribozomas ha cambiado el pensamiento sobre el origen de la vida en la tierra porque las moléculas de RNA, a diferencia de las proteínas, son capaces de replicarse a sí mismas.

Problemas

Los problemas de mayor dificultad están marcados con un •.

6.1 La necesidad de las enzimas. Nos encontramos ahora en disposición de apreciar la diferencia entre la factibilidad termodinámica de una reacción y la probabilidad de que realmente vaya a tener lugar.

(a) Muchas reacciones que son posibles termodinámicamente no ocurren a una velocidad apreciable, debido a las necesidades energéticas de los reactivos para superar el estado de transición. ¿Qué significa esto en términos moleculares?

(b) Una forma de cumplir este requerimiento es mediante aportación de calor, que en algunos casos, sólo es preciso al inicio. Dé un ejemplo, y explique lo que significa en términos moleculares.

(c) Una solución alternativa es reducir la energía de activación. ¿Qué significa en términos moleculares decir que un catalizador disminuye la energía de activación de una reacción?

(d) Los químicos orgánicos usan a menudo en sus reacciones, catalizadores inorgánicos tales como el níquel, el platino, o ciertos cationes, mientras que las células usan proteínas denominadas enzimas. ¿Cuáles son las ventajas del uso de las enzimas? ¿Y las desventajas?

6.2 Energía de activación. Como se muestra en la Reacción 6.2, el peróxido de hidrógeno, H_2O_2, se descompone en H_2O y O_2. La energía de activación, E_A, para la reacción no catalizada a 20 °C es de 18 kcal/mol. La reacción se puede catalizar por iones de hierro (E_A = 13 kcal/mol) o por la enzima *catalasa* (E_A = 7 kcal/mol).

(a) Dibuje un diagrama de energía de activación para esta reacción bajo condiciones de catalización y no catalización, y explique lo que significa que la energía de activación baje de 18 a 13 kcal/mol, cuando se usan iones de hierro y de 18 a 7 kcal/mol en presencia de la catalasa.

(b) Sugiera dos propiedades de la catalasa que hagan de ella un catalizador intracelular más apropiado que los iones de hierro.

(c) Sugiera una forma más de acelerar la tasa de la descomposición del peróxido de hidrógeno. ¿Es éste un medio apropiado de incrementar las velocidades de reacción dentro de las células? ¿Por qué o por qué no?

(d) Recuerde del Capítulo 4 que la catalasa presente en las células eucariotas se localiza dentro de los peroxisomas, junto con cualquiera de las diversas enzimas generadoras de H_2O_2. Debido a la toxicidad del peróxido de hidrógeno, explique en términos de cinética enzimática por qué es ventajoso tener a las enzimas generadoras de H_2O_2 y la catalasa juntas dentro de un mismo orgánulo.

6.3 Incremento de la velocidad mediante la catálisis. La descomposición de H_2O_2 en H_2O y O_2 mostrada en la Reacción 6.2 se puede catalizar, bien por un catalizador inorgánico (iones de hierro), bien por la enzima catalasa. Esta reacción tiene lugar unas 30.000 veces más rápida en presencia de iones de hierro, que cuando no hay catalizador, pero hasta 100.000.000 veces más rápida en presencia de la catalasa, una enzima que contiene hierro. Conteste a las siguientes preguntas, asumiendo que 1 μg de catalasa descompone una cantidad dada de H_2O_2 en 1 minuto a 25 °C y que todas las reacciones se llevan a cabo en condiciones estériles.

(a) ¿Cuánto tiempo se necesitaría para descomponer la misma cantidad de H_2O_2 en presencia de una cantidad de iones de hierro equivalente al contenido en hierro de 1 μg de catalasa?

(b) ¿Cuánto tardaría en descomponerse la misma cantidad de H_2O_2 en ausencia de un catalizador?

(c) Explique cómo éstos ilustran cálculos la necesidad de los catalizadores y la superioridad de las enzimas sobre los catalizadores inorgánicos.

6.4 Efectos de la temperatura y el pH. La Figura 6.4 muestra las actividades de las enzimas en función de la temperatura y el pH. En general, la actividad de una enzima específica es más alta a la temperatura y el pH que son característicos del ambiente en el cual funciona normalmente.

(a) Explique las formas de las curvas de la Figura 6.4 en base a los factores químicos o físicos más determinantes en la actividad de la enzima.

(b) Para cada enzima de la Figura 6.4, sugiera la ventaja adaptativa de tener el perfil de actividad enzimática mostrado en la figura.

(c) Algunas enzimas tienen un perfil de pH plano, es decir, tienen esencialmente la misma actividad sobre un rango amplio de pH. ¿Cómo podría explicar esta observación?

6.5 Cinética de Michaelis-Menten. La Figura 6.20 representa la gráfica de Michaelis-Menten de una enzima típica, con una velocidad inicial de reacción expresada como una función de la concentración de sustrato. En la curva se identifican tres regiones, mediante las letras A, B y C. Para cada una de las afirmaciones que siguen, indique con una única letra cuál de las 3 regiones de la curva se ajusta mejor a la afirmación.

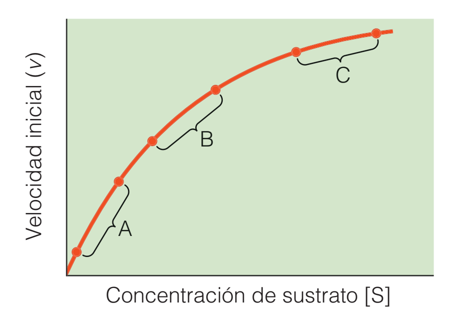


Figura 6.20 Análisis de la representación de Michaelis-Menten. *Veáse* el Problema 6.5.

(a) El sitio activo de una molécula de enzima está ocupado por el sustrato la mayor parte del tiempo.

(b) El sitio activo de una molécula de enzima está libre la mayor parte del tiempo.

(c) El rango de concentración del sustrato en el cual la mayoría de las enzimas funcionan en las células normales.

(d) Incluya el punto (K_m, $V_{max}/2$).

(e) La velocidad de la reacción está limitada, principalmente, por el número de moléculas de enzima presentes.

(f) La velocidad de la reacción está limitada, principalmente, por el número de moléculas de sustrato presentes.

6.6 Cinética enzimática. La enzima β-galactosidasa cataliza la hidrólisis del disacárido lactosa en sus componentes monosacáridos:

$$\text{Lactosa} + H_2O \xrightarrow[\beta\text{-galactosidasa}]{} \text{Glucosa} + \text{Galactosa} \qquad \textbf{(6.17)}$$

Para determinar V_{max} y K_m de la β–galactosidasa para la lactosa, se incubó la misma cantidad de enzima (1 μg por tubo) con una serie de concentraciones de lactosa, en condiciones en las que las concentraciones de producto eran despreciables. La velocidad de la reacción inicial se determinó para cada concentración de lactosa, valorando la cantidad de este disacárido que permanece al final del ensayo. Se obtuvieron los siguientes datos:

Concentración de lactosa (mM)	Velocidad del consumo de lactosa (μmol/min)
1	10,0
2	16,7
4	25,0
8	33,3
16	40,0
32	44,4

(a) ¿Por qué es necesario especificar que las concentraciones de producto eran insignificantes durante el curso de la reacción?

(b) Represente v (velocidad del consumo de lactosa) frente a [S] (concentración de lactosa). ¿Por qué cuando se dobla la

concentración de lactosa, el incremento de la velocidad es siempre menor que el doble?

(c) Calcule $1/v$ y $1/[S]$ para cada entrada en la tabla de datos y trace $1/v$ frente $1/[S]$.

(d) Determine K_m y V_{max} a partir de la representación doble recíproca.

(e) En la misma gráfica de la parte b, represente los resultados que esperaría si cada tubo contuviera sólo 0,5 μg de enzima. Explique el gráfico.

6.7 Más cinética enzimática. La galactosa formada en la Reacción 6.17 se puede fosforilar mediante la transferencia de un grupo fosfato desde el ATP, reacción que es catalizada por la enzima galactoquinasa:

$$\text{Galactosa} + \text{ATP} \xrightarrow[\text{galacquinasa}]{} \text{Galactosa-1-fosfato} + \text{ADP} \quad \textbf{(6.18)}$$

Suponga que ha aislado la enzima galactoquinasa y ha determinado sus parámetros cinéticos, variando la concentración de galactosa en presencia de una concentración de ATP constante y alta (es decir, en saturación). La representación doble recíproca (Lineweaver-Burk) de los datos se muestra en la Figura 6.21.

(a) ¿Cuál es la K_m de la galactosidasa, para la galactosa, en estas condiciones de experimentación? ¿Qué nos dice la K_m acerca de la enzima?

(b) ¿Cuál es la V_{max} de la enzima en estas condiciones de experimentación? ¿Qué nos dice la V_{max} acerca de la enzima?

(c) Suponga que repite el experimento, pero variando la concentración de ATP y manteniendo a la galactosa en niveles altos y constantes. Asumiendo que las demás condiciones se mantienen como antes, ¿esperaría obtener la misma V_{max} que en el apartado b? ¿Por qué o por qué no?

(d) En el experimento descrito en el apartado c, el valor de K_m es muy diferente al del apartado b. ¿Puede explicar por qué?

6.8 El número de recambio. La anhidrasa carbónica cataliza la hidratación reversible del dióxido de carbono para formar ion bicarbonato:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+ \quad \textbf{(6.19)}$$

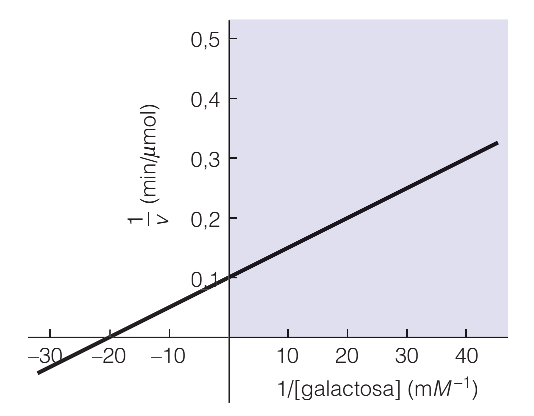


Figura 6.21 Representación doble recíproca de la enzima galactoquinasa. *Veáse* el Problema 6.7.

Esta reacción es, como descubriremos en el Capítulo 8, básica en el transporte del dióxido de carbono en los glóbulos rojos, desde los tejidos del cuerpo a los pulmones. La anhidrasa carbónica tiene un peso molecular de 30.000 y un número de recambio (valor k_{cat}) de 1×10^6 sec^{-1}. Suponga que se le da 1 mL de una solución que contiene 2,0 μg de anhidrasa carbónica pura.

(a) ¿A qué velocidad (milimoles de CO_2 consumidos por segundo) tendrá lugar esta reacción en condiciones óptimas?

(b) Suponiendo normales la temperatura y la presión, ¿cuál es el consumo de CO_2 en mL por segundo?

6.9 Inhibidores de varias clases. Conteste, razonando en cada caso, cuáles de las siguientes afirmaciones son verdaderas (V) o falsas (F).

(a) El di-isopropil fluorofosfato se une covalentemente al grupo hidroxilo del residuo de un aminoácido específico de la enzima problema, siendo, por tanto, casi con toda certeza, un efector alostérico.

(b) La enzima hexoquinasa se inhibe por su propio producto, la glucosa-6-fostato y, por tanto, es un ejemplo de retroinhibición.

(c) La glucógeno sintasa, como la glucógeno fosforilasa, es activa en la forma fosforilada e inactiva en la forma defosforilada.

(d) Es muy probable que una enzima que está sujeta a la activación alostérica, catalice la primera reacción de una vía biosintética.

(e) Si los investigadores sostienen que una enzima es activada alostéricamente por el compuesto A e inhibida alostéricamente por el compuesto B, una de estas afirmaciones debe estar equivocada.

(f) La tioredoxina es una proteína reguladora con dos grupos sulfhidrilo (–SH) que se pueden oxidar de manera reversible, formando un enlace disulfuro (–S–S–). Probablemente afecte a la actividad de una enzima a la que se una, reduciendo los puentes disulfuro de la enzima a grupos sulfhidrilo, haciendo que la enzima experimente un cambio conformacional que conduzca a su activación.

•**6.10 Relevancia biológica.** Explique la relevancia biológica de cada una de las siguientes observaciones relativa a la regulación de enzimas.

(a) Cuando usted necesita un aporte de energía, las hormonas adrenalina y glucagón se secretan hacia su torrente sanguíneo y se dirigen a sus células musculares, donde inician una cascada de reacciones que conducen a la fosforilación de la forma inactiva *(b)* de la glucosa fosforilasa, que pasa a la forma activa (*a*).

(b) Incluso en la forma *a*, la glucosa fosforilasa de las células musculares, se inhibe alostéricamente por glucosa o ATP, en concentraciones elevadas.

(c) Su páncreas sintetiza y secreta la enzima proteolítica carboxipeptidasa en forma de precursor inactivo, llamado procarboxipeptidasa, que se activa como resultado de la proteolisis, mediante tripsina, en el duodeno.

•**6.11 Consecuencias de la ecuación de Michaelis-Menten.** Para la reacción catalizada por la enzima en la cual el sustrato S se convierte en un producto P (*véase* Reacción 6.5), la velocidad se puede definir como la desaparición del sustrato o la aparición del producto por unidad de tiempo:

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = +\frac{d[P]}{dt} \qquad (6.20)$$

Partiendo de esta definición y restringiéndonos a la etapa inicial de reacción, cuando [P] es prácticamente cero, derive la ecuación de Michaelis-Menten (*véase* la Ecuación 6.7). Los siguientes apartados pueden ayudarle en su derivación:

(a) Comience expresando la ecuación de la velocidad para $d[S]/dt$, $d[P]/dt$, y $d[ES]/dt$ en términos de concentraciones y velocidades constantes.

(b) Suponga un estado estacionario en el cual el complejo enzima-sustrato de la Reacción 6.6 desaparece a la misma velocidad a la que se forma, de forma que la tasa neta del cambio, $d[ES]/dt$, es cero.

(c) Dese cuenta de que la cantidad total de la enzima presente, E_t, es la suma de la enzima libre E_f más la que está en el complejo enzima ES: $E_t = E_f + ES$.

(d) En su debido momento, se dará cuenta de que la V_{max} y la K_m se pueden definir como sigue:

$$V_{max} = k_3[E_t] \qquad K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \qquad (6.21)$$

•**6.12 La ecuación de Michaelis-Menten en forma lineal.** Además de la representación de Lineweaver-Burk (Figura 6.10), a veces se emplean otras dos formas lineales de la ecuación de Michaelis-Menten. La representación de Eadie-Hofstee es una gráfica de $v/[S]$ frente a v (*véase* Figura 6.11), y la representación de Hanes-Woolf enfrenta a $[S]/v$ y a $[S]$.

(a) Demuestre, en ambos casos, que la ecuación que se representa gráficamente se puede obtener a partir la ecuación de Michaelis-Menten, con una simple manipulación aritmética.

(b) En ambos casos, indique cómo se pueden determinar K_m y V_{max} desde el gráfico resultante.

(c) Haga una representación de Hanes-Woolf, señalando los puntos de intersección y la pendiente como en las representaciones de Lineweaver-Burk y de Eadie-Hofstee (*véanse* Figuras 6.10 y 6.11). ¿Puede sugerir por qué la representación Hanes-Woolf es la más satisfactoria, desde el punto de vista estadístico, de las tres?

Bibliografía recomendada

Las referencias con importancia histórica están marcadas con •.

Referencias generales

Colowick, S. P. y N. O. Kaplan, eds. *Meth. Enzymol.* New York: Academic Press, 1970–present (ongoing series).

Copeland, R. A. *Enzymes: A Practical Introduction to Structures, Mechanisms, and Data Analysis.* New York: Wiley, 2000.

Lehninger, A. L., D. L. Nelson y M. M. Cox. *Principles of Biochemistry*, 3rd ed. New York: Worth, 1999.

Mathews, C. K., K. E. van Holde y K G. Ahern. *Biochemistry*, 3rd ed. San Francisco: Benjamin/Cummings, 2000.

Price, N. C. y L. Stevens. *Fundamentals of Enzymology: The Cell and Molecular Biology of Catalytic Proteins.* New York: Oxford University Press, 1999.

Purich, D. L. y R. D. Allison. *The Enzyme Reference: A Comprehensive Guidebook to Enzyme Nomenclature, Reactions, and Methods.* Boston: Academic Press, 2002.

Referencias históricas

•Changeux, J. P. The control of biochemical reactions. *Sci. Amer.* 212 (abril de 1965): 36.

•Cori, C .F. James B. Sumner and the chemical nature of enzymes. *Trends Biochem. Sci.* 6 (1981): 194.

•Friedmann, H., ed. *Benchmark Papers in Biochemistry. Vol. 1: Enzymes.* Stroudsburg, PA: Hutchinson Ross, 1981.

•Monod, J., J. P. Changeux, and F. Jacob. Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* 6 (1963): 306.

•Phillips, D. C. The three-dimensional structure of an enzyme molecule. *Sci. Amer.* 215 (noviembre de 1966): 78.

Función y estructura de enzimas

DeSantis, G. y J. B. Jones. Chemical modification of enzymes for enhanced functionality. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10 (1999): 324.

Erlandsen, H., E. E. Abola y R. C. Stevens. Combining structural genomics and enzymology: completing the picture in metabolic pathways and enzyme active sites. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10 (2000): 719.

Fersht, A. *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding.* New York: W.H. Freeman, 1999.

Northrop, D. B. Rethinking fundamentals of enzyme activity. *Adv. Enzymol.* 73 (1999): 25.

Suckling, C. J., C. L. Gibson y A. R. Pitt., eds. *Enzyme Chemistry: Impact and Applications*, 3rd ed. New York: Blackie Academic & Professional, 1998.

Walsh, C. Enabling the chemistry of life. *Nature* 409 (2001): 226.

Mecanismos de la catálisis enzimática

Bisswange, H. *Enzyme Kinetics: Principles and Methods.* Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2001.

Frey, P.A. y D. B. Northrop, eds. *Enzymatic Mechanisms.* Washington, DC: IOS Press, 1999.

Maragoni, A. G. *Enzyme Kinetics: A Modern Approach.* Hoboken, NJ: Wiley Interscience, 2003.

Matthews, J. N. y G. C. Allcock. Optimal designs for Michaelis-Menten kinetic studies. *Stat. Med.* 23 (2004): 477.

Murphy, E. F., M. J. C. Crabbe y S. G. Gilmour. Effective experimental design: Enzyme kinetics in the bioinformatics era. *Drug. Disc. Today* 7 (2002): S187.

Tsou, C. L. Active site flexibility in enzyme catalysis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 864 (1998): 1.

Ribozimas: RNA como una enzima

•Cech, T. R. The chemistry of self-splicing RNA and RNA enzymes. *Science* 236 (1987): 1532.

Jaeger, L. The new world of ribozymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7 (1997): 324.

Joyce, G. L. Building the RNA world: Ribozymes. *Curr. Biol.* 6 (1996): 965.

Krupp, G. y R. K. Gaur. *Ribozymes: Biochemistry and Biotechnology*. Natick, MA: Eaton Publishing, 2000.

Noller, H. F., V. Hoffarth y L. Zimniak. Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science* 256 (1992): 1416.

7

Membranas: estructura, química y función

Una característica fundamental de todas las células es la presencia de **membranas** que definen los límites de la célula y de sus diversos compartimentos internos. Es probable que incluso el observador ocasional de micrografías electrónicas se quede impactado por la prominencia de membranas rodeando las células y dentro ellas, especialmente las de los organismos eucarióticos (Figura 7.1). De manera introductoria, nos hemos encontrado con las membranas y los orgánulos rodeados por membrana en el Capítulo 4; ahora estamos preparados para tratar en mayor detalle la estructura y función de la membrana. En este capítulo, examinaremos la estructura molecular de las membranas y exploraremos los múltiples papeles que las membranas desempeñan en la vida de la célula. En el Capítulo 8 trataremos el transporte de solutos a través de la membrana poniendo más énfasis en los mecanismos implicados.

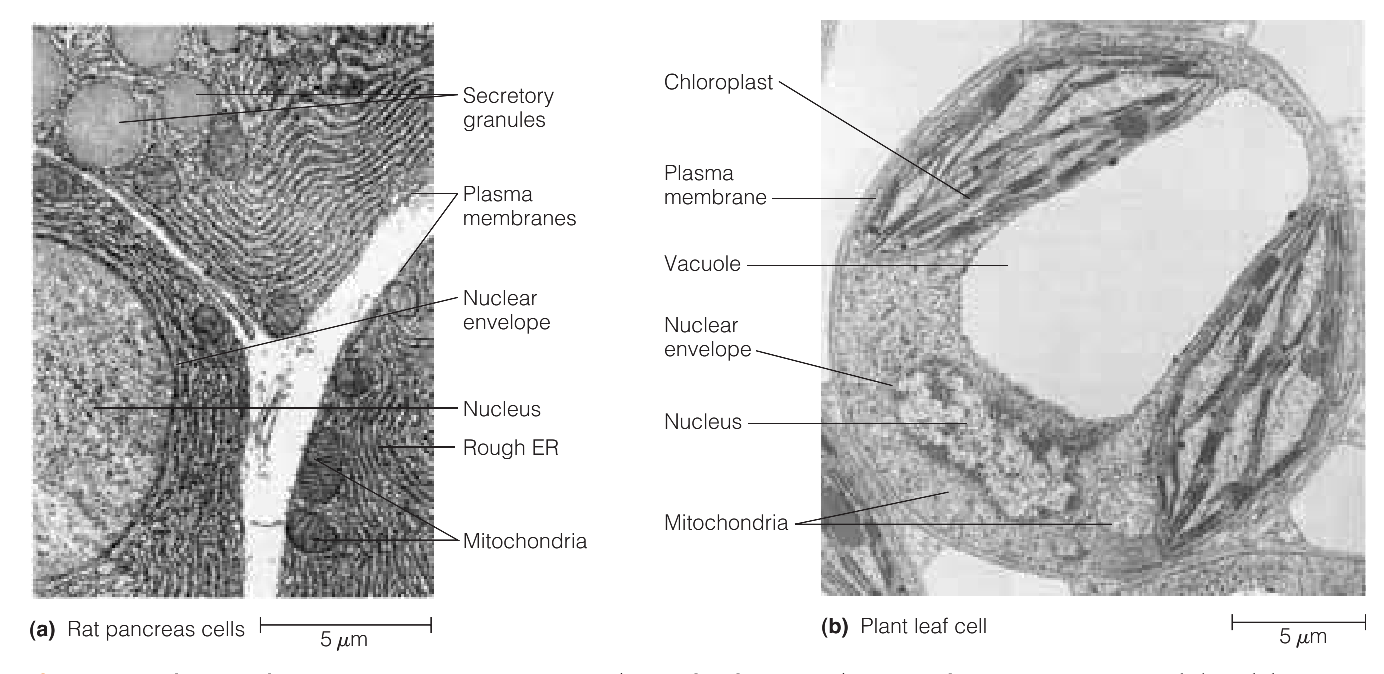


Figura 7.1 La importancia de las membranas que rodean y están en el interior de las células eucariotas. Las estructuras de las células eucariotas que están relacionadas con membranas son además de la membrana plasmática, el núcleo, los cloroplastos, las mitocondrias, el retículo endoplasmático (RE), los gránulos secretores y las vacuolas. Estas estructuras se muestran aquí en (**a**) porciones de tres células del páncreas de rata y (**b**) una célula de una hoja de una planta (MET).

Las funciones de las membranas

Comenzamos nuestra discusión fijándonos en que las membranas biológicas, como se ilustra en la Figura 7.2, desempeñan cinco papeles relacionados entre sí, pero distintos. ① definen los límites de la célula y limitan sus compartimentos. ② sirve como sitio concreto donde se realizan funciones específicas y ③ poseen proteínas de transporte que facilitan y regulan el movimiento de sustancias hacia el interior y hacia el exterior de la célula y de sus compartimentos. Además, las membranas ④ contienen los receptores necesarios para detectar señales externas y ⑤ proporcionan los mecanismos para la comunicación intercelular. Cada una de estas funciones se describe brevemente en las siguientes cinco secciones.

① Las membranas definen límites y sirven como barreras de permeabilidad

Una de las funciones más obvias de las membranas es definir los límites de la célula y sus compartimentos y servir como barreras de permeabilidad. El interior de la célula debe estar separado físicamente del medio ambiente que le rodea no sólo para mantener las sustancias deseadas en la célula sino para mantener fuera de ella a las sustancias no deseadas. Las membranas sirven bien para este propósito porque el interior hidrofóbico de la membrana es una barrera de permeabilidad efectiva para las moléculas hidrofílicas e iones. La barrera de permeabilidad de una célula en su conjunto es la membrana **plasmática** (o **celular**), una membrana que rodea a la célula y regula el paso de materiales hacia dentro y hacia fuera de las células. Además de la membrana plasmática, varias **membranas intracelulares** sirven para compartimentalizar funciones dentro de las células eucarióticas.

② En las membranas se sitúan proteínas específicas y por tanto son los lugares donde se realizan funciones específicas

Las membranas tienen funciones específicas asociadas a ellas ya que las moléculas y estructuras responsables de estas funciones —proteínas en la mayor parte de los casos— están incluidas o localizadas en las membranas. De hecho, una de las maneras más útiles para caracterizar una membrana específica, es describir las enzimas concretas, las proteínas de transporte, los receptores y otras moléculas asociadas a ellas.

Por ejemplo, muchas enzimas características están presentes en las membranas, o sobre ellas, de orgánulos tales como la mitocondria, el cloroplasto, el retículo endoplasmático (RE), el complejo de Golgi, los lisosomas y los peroxisomas, como aprenderemos en los Capítulos 10, 11 y 12. A menudo, tales enzimas, resultan útiles como *marcadores* durante el aislamiento de orgánulos a partir de suspensiones de células desorganizadas. Por ejemplo, la *glucosa fosfatasa* es una enzima ligada a la membrana que se encuentra en el retículo endoplasmático. Cuando las membranas del RE se aíslan y se purifican (como pequeñas vesículas denominadas *microsomas*), la glucosa fosfatasa se

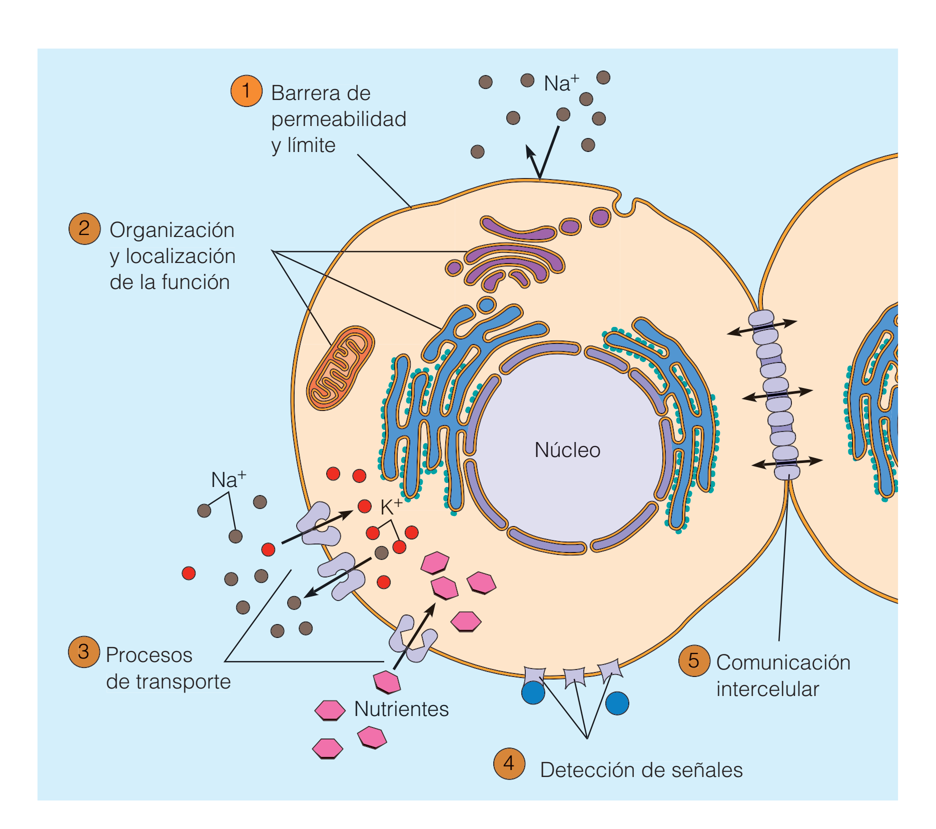


Figura 7.2 Función de las membranas. Las membranas ① definen los límites de la célula y de sus orgánulos, ② sirven como sitio donde se localizan proteínas específicas, especialmente enzimas y receptores, ③ proporcionan y regulan procesos de transporte, ④ contienen los receptores necesarios para detectar señales externas y ⑤ proporcionan mecanismos de contacto, comunicación y adhesión intercelular.

puede utilizar como enzima marcadora, que le permite al investigador determinar la distribución de los microsomas entre las diferentes fracciones. Las enzimas marcadoras de otros orgánulos se utilizan para evaluar la pureza de la preparación final de microsomas, es decir, el grado al que está libre de contaminación por estos otros marcadores.

③ Las proteínas de membrana regulan el transporte de solutos

Otra función de las proteínas de membrana es realizar y regular el **transporte** de sustancias hacia dentro y hacia fuera de la célula y de sus orgánulos. Nutrientes, iones, gases, agua y otras sustancias se captan en diversos compartimentos y varios productos y desechos se retiran.

Como veremos en el Capítulo 8, las modalidades de transporte de las distintas sustancias difieren. Muchas sustancias se mueven a través de la membrana en la dirección dictada por su *gradiente de concentración*. Por otro lado, el movimiento de un ion está determinado por su *potencial electroquímico*, que es la suma de su gradiente de concentración y el gradiente de carga a través de la membrana. Este proceso, que no requiere energía porque el movimiento es a favor del gradiente, ocurre de dos formas diferentes. Algunas moléculas como agua, oxígeno y etanol pueden atravesar las membranas por *difusión simple*. Las moléculas más grandes tales como azúcares y aminoácidos se mueven a través de la membrana ayudadas por *proteínas de transporte* específicas, un proceso denominado *difusión facilitada*.

De manera alternativa, una sustancia se puede transportar *en contra de* su gradiente de concentración si no está cargada o en contra de su potencial electroquímico, en el caso de un ion. Éste es un proceso denominado *transporte activo* que requiere energía. Solutos tales como azúcares y aminoácidos están a menudo presentes en bajas concentraciones fuera de la célula y se transportan hacia el interior en contra de sus respectivos gradientes de concentración y electroquímico. La energía necesaria para guiar este transporte en contra de gradiente viene proporcionada por la hidrólisis de ATP o de un compuesto similar de alta energía, y el proceso se denomina *transporte activo directo*. De manera alternativa, la energía puede ser proporcionada acoplando el transporte en contra de gradiente del soluto al transporte a favor de gradiente de los iones de sodio o de protones a través de la misma membrana, un proceso denominado *transporte activo indirecto*. La fuerza impulsora para el movimiento «favorable» de los iones de sodio o de los protones es su potencial electroquímico, que depende del gradiente de carga y del gradiente de concentración del ion a través de la membrana.

Incluso se pueden transportar a través de membranas moléculas tan grandes como las proteínas. En algunos casos, vesículas intracelulares facilitan el movimiento de tales moléculas hacia la célula (*endocitosis*) o hacia fuera de la célula (*exocitosis*). En otros casos, las proteínas sintetizadas en el retículo endoplasmático o en el citosol se pueden importar por orgánulos específicos rodeados por membrana como lisosomas, peroxisomas o mitocondrias. Trataremos cada uno de estos procesos en capítulos posteriores.

④ Las proteínas de membrana detectan y transmiten señales eléctricas y químicas

Normalmente, las células reciben información de su entorno en forma de señales eléctricas o químicas que afectan a la superficie externa de la célula. Los impulsos nerviosos enviados desde sus ojos a su cerebro a medida que lee estas palabras son ejemplos de tales señales, como lo son las diferentes hormonas presentes en su sistema circulatorio. El término utilizado para describir tanto la detección de señales específicas en la superficie externa de las células como los mecanismos específicos usados para transmitir tales señales al interior celular es la **transducción de señales**.

En el caso de la transducción de señales químicas, algunas moléculas señal entran directamente en las células y actúan en su interior. Los estrógenos son un ejemplo. los estrógenos son esteroides (*véase* Figura 3.30a), no son polares y además pueden atravesar la membrana fácilmente. El resultado es que los estrógenos entran en sus células diana e interactúan con proteínas reguladoras del interior de la célula. Sin embargo, en la mayoría de los casos, las moléculas señalizadoras, que afectan a una membrana, no entran en la célula, en vez de eso se unen a proteínas específicas de la superficie externa de la membrana plasmática, denominadas **receptores**. La unión de estas sustancias denominadas *ligandos*, se continúa en la superficie interna de la membrana, con acontecimientos químicos específicos generando de ese modo señales internas denominadas *segundos mensajeros*. Por eso, los receptores de membrana permiten a las células reconocer, transmitir y responder a una gran variedad de señales químicas específicas, un tema que exploraremos en el Capítulo 14.

⑤ Las proteínas de membrana median en la adhesión celular y la comunicación célula-célula

Las proteínas de membrana también median en la adhesión y la comunicación entre células adyacentes. Aunque con frecuencia, los libros de texto representan a las células como entidades aisladas, separadas, la mayoría de las células de los organismos multicelulares están en contacto con otras células, a través de conexiones citoplasmáticas directas, que permiten, al menos, el intercambio de algún componente celular. Esta **comunicación intercelular** viene proporcionada por las *uniones gap* en las células animales y por los *plasmodesmos* de las células vegetales.

Todas las funciones que acabamos de considerar —compartimentalización, localización de función, transporte, detección de señales y comunicación intercelular—

dependen de la composición química y de las característi-cas estructurales de las membranas. Volveremos a estos temas cuando consideremos cómo se ha elaborado el conocimiento actual de la estructura de la membrana.

Modelos de la estructura de la membrana: una perspectiva experimental

Hasta que no se aplicó la microscopía electrónica para el estudio de la estructura celular, a principios de la década de 1950, nadie había visto nunca una membrana. Hasta ese momento, las evidencias indirectas habían conducido a los biólogos a postular la existencia de membranas mucho antes de que se hubieran podido ver en realidad. De hecho, los investigadores habían tratado de entender, durante más de un siglo, la organización molecular de las membranas. Las células contienen muchos tipos de membranas diferentes, por esta razón, ha supuesto un gran esfuerzo encontrar las características estructurales comunes a todas ellas. Sin embargo, valió la pena el intenso esfuerzo realizado en investigación ya que condujo al modelo de la estructura de membrana del *mosaico fluido*. Este modelo, del que ahora se piensa que sirve para describir a todas las membranas biológicas, imagina a la membrana como dos capas de lípidos bastante fluidas, con proteínas localizadas dentro y sobre las capas lipídicas y orientadas de forma específica con respecto a las dos superficies de membrana. Probablemente en el futuro, el modelo del mosaico fluido se redefinirá ya que las capas de lípidos se están convirtiendo en algo mucho más complejo de lo que inicialmente se pensó. Sin embargo, el modelo básico tal y como se imagina hoy en día es, casi con certeza, correcto.

Antes de mirar el modelo en detalle, describiremos alguno de los experimentos principales que han conducido hasta esta visión de la función y de la estructura de la membrana. A medida que lo hacemos, puede profundizar sobre cómo se han realizado esos descubrimientos, así como conocer todos los aspectos de la diversidad de enfoques y técnicas que son necesarios para el avance del entendimiento de un fenómeno biológico. La Figura 7.3 muestra la cronología de los estudios sobre la estructura de la membrana, que comenzó aproximadamente hace un siglo con el entendimiento de que las capas de lípidos forman parte de la estructura de la membrana y finalmente nos llevan al conocimiento actual en el que se considera a las membranas como mosaicos fluidos. Consulte la Figura 7.3 cuando lea la siguiente sección.

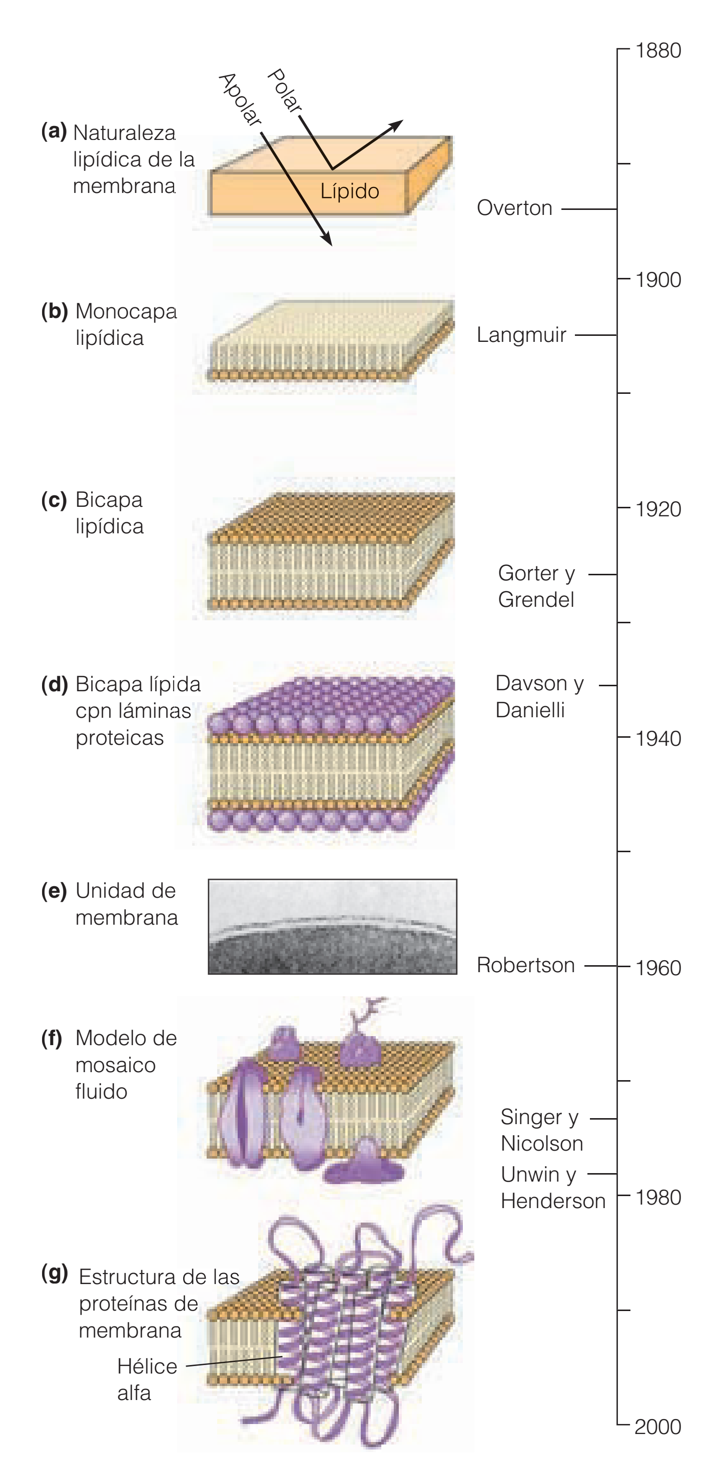


Figura 7.3 Cronograma del desarrollo del modelo de mosaico fluido. El modelo de mosaico fluido de estructura de membrana propuesto por Singer y Nicholson en 1972 fue la culminación de unos estudios que se remontan a 1890 y que habían sido redefinidos de manera muy significativa por estudios posteriores.

Overton y Langmuir: los lípidos son componentes importantes de la membrana

Un buen punto de partida para esta revisión experimental es el trabajo pionero de Charles Overton hacia 1890. Trabajando con células de raíces aéreas de plantas, observó que las sustancias solubles en lípidos penetran fácilmente en las células, mientras que las solubles en agua, no. En realidad él encontró una buena correlación entre la naturaleza *lipofílica* de una sustancia («amante de lípidos») y la

facilidad con la que puede entrar en las células. De estos estudios Overton concluyó que los lípidos presentes en la superficie celular son una especie de «cubierta» (Figura 7.3a). Él incluso sugirió que las cubiertas celulares son probablemente una mezcla de colesterol y lecitina, lo que se comprobó que era claramente previsible en base a lo que ahora conocemos sobre la importancia de los esteroles y fosfolípidos como componentes de la membrana.

Un segundo e importante avance vino una década después mediante el trabajo de Irving Langmuir, que estudió el comportamiento de fosfolípidos purificados disueltos en benceno y produjo capas de esa solución de benceno y lípidos sobre una superficie acuosa. Cuando el benceno se evapora, las moléculas permanecen como una lámina de lípidos de una molécula de ancho —que se denomina «monocapa»—. Langmuir sabía que los fosfolípidos son moléculas *anfipáticas* que poseen tanto regiones hidrofílicas como hidrofóbicas (*véase* Figura 2.11 para ilustrar los grupos de las cabezas polares y las «colas» no polares de las moléculas de fosfolípidos). Él razonó, que los fosfolípidos se orientan sobre el agua de forma que sus cabezas hidrofílicas están en contacto con el agua y que sus colas hidrofóbicas sobresalen del agua (Figura 7.3b). La monocapa lipídica de Langmuir fue la base que permitió nuevos estudios sobre la estructura de la membrana en los primeros años del siglo XX.

Gorter y Grendel: la base de la estructura de la membrana es una bicapa lipídica

El siguiente avance importante se produjo en 1925 cuando dos fisiólogos holandeses E. Gorter y F. Grendel leyeron los trabajos de Langmuir y pensaron que este enfoque podría ayudar a contestar una cuestión referente a la membrana de los glóbulos rojos, o *eritrocitos*, con los que ellos trabajaban. Los trabajos iniciales de Overton habían mostrado la presencia de una cubierta lipídica en la membrana celular. ¿Pero cuántas capas lipídicas están presentes en la cubierta? Para contestar a esta pregunta Gorter y F. Grendel extrajeron los lípidos de un número conocido de eritrocitos y usaron el método de Langmuir para expandir los lípidos en una superficie acuosa. Encontraron que el área de la superficie de los lípidos sobre el agua era aproximadamente dos veces el área de las membranas de los eritrocitos, por lo que concluyeron que la membrana plasmática de los eritrocitos no consiste en una, sino en dos capas de lípidos. (Como se descubrió después, Grendel y Gorter cometieron dos errores, subestimaron un tercio del área superficial de los glóbulos rojos y un tercio de la cantidad de lípidos presentes en su membrana plasmática. Más aún, no tuvieron en cuenta la porción significativa que ocupan las proteínas en la membrana de los glóbulos rojos. Sin embargo, afortunadamente esos errores se abolieron uno con otro, por ello la conclusión de Gorter y Grendel fue correcta aunque sus datos no. Para tener una oportunidad de repetir sus cálculos y descubrir la fuente de sus errores, *véase* Problema 7.3 al final del capítulo.

Hipotetizando la existencia de una estructura de bicapa, Gorter y Grendel razonaron que sería favorable termodinámicamente que las cadenas hidrocarbonadas no polares estuvieran hacia el interior, fuera del medio acuoso que aparece a ambos lados de la membrana. Los grupos polares hidrofílicos de cada capa estarían dirigidos hacia el exterior, hacia el entorno acuoso que existe a cada lado de la membrana (Figura 7.3c). Sus experimentos y conclusiones fueron temporales ya que este trabajo representó el primer intento para entender las membranas desde el punto de vista molecular. Más aún, la **bicapa lipídica** que ellos imaginaron llegó a ser la base de cada ajuste sucesivo en el entendimiento de la estructura de la membrana.

Davson y Danielli: las membranas también contienen proteínas

Poco después de que Gorter y Grendel propusieran el modelo de bicapa en 1925, quedó claro que una característica importante de la estructura de la membrana era que se trataba de una bicapa lipídica simple, sin embargo este hecho, no podía explicar todas las propiedades de la estructura de la membrana, particularmente todas aquéllas relacionadas con la *tensión superficial*, *permeabilidad a los solutos* y *resistencia eléctrica*. Por ejemplo, la tensión superficial de una película lipídica fue significativamente mayor que la de las membranas celulares pero ésta se podía bajar añadiendo proteínas a la película lipídica. Más aún, azúcares, iones y otros solutos hidrofílicos se movían hacia dentro y hacia fuera de las células mucho más fácilmente de lo que se podía explicar por la permeabilidad a las sustancias solubles en agua de las bicapas lipídicas puras.

Para explicar estas diferencias, Hugh Davson y James Danielli imaginaron la presencia de proteínas en las membranas proponiendo en 1935 que las membranas biológicas consisten en una bicapa lipídica que están recubiertas en ambos lados con finas láminas de proteínas (Figura 7.3d). De manera que el *modelo* original de *Davson y Danielli* era en esencia el «modelo sándwich» de proteína-lípido-proteína. Su modelo fue la primera representación detallada de la organización de la membrana, que imperó en el pensamiento de los biólogos celulares en las décadas siguientes.

El modelo original fue modificado posteriormente para acomodar los descubrimientos posteriores. Particularmente notable fue la sugerencia, hecha en 1954, de que las proteínas hidrofílicas podían atravesar la membrana y formarían *poros polares* en lo que anteriormente era una bicapa hidrofóbica. Esas proteínas podían cambiar la permeabilidad y las propiedades de resistividad de la membrana, que no podían ser explicadas fácilmente en términos de la existencia de una bicapa lipídica solamente. Específicamente, el interior lipídico responsable de las pro-

piedades hidrofóbicas de la membrana y los componentes proteicos explican sus propiedades hidrofílicas.

La importancia real del modelo de Davson-Danielli, sin embargo, fue el reconocimiento de la importancia de la presencia de proteínas en la estructura de la membrana. Esta característica, más que cualquier otra, hizo que el modelo de sándwich de Davson-Danielli fuera la base para la mayoría de la investigación posterior sobre la estructura de la membrana.

Robertson: todas las membranas comparten una estructura subyacente común

Todos los modelos de membrana tratados hasta el momento se desarrollaron mucho antes de que nadie hubiera visto una membrana biológica y cada uno de ellos se pensó específicamente como un modelo de membrana plasmática. Con la llegada de la microscopía electrónica en la década de 1950, los biólogos celulares pudieron finalmente verificar la presencia de una membrana plasmática alrededor de cada célula. Además, observaron que la mayoría de los orgánulos subcelulares estaban limitados por membranas similares. Además, cuando las membranas se tiñeron con osmio, un metal pesado, y se examinaron con detalle a gran aumento, se observó que había regiones extensas con aspecto de «vía férrea» que aparecían como dos líneas oscuras separadas por una zona central teñida tenuemente, con un espesor total de 6-8 nm. Este patrón se observa en la membrana plasmática de dos células adyacentes separadas una de otra por un espacio intercelular fino (Figura 7.4). El hecho de que este mismo patrón de tinción *trilaminar*, o de tres capas, se observase en distintas clases de membranas condujo a J. David Robertson a sugerir que todas las membranas celulares compartían una estructura subyacente común, que denominó *la unidad de membrana* (Figura 7.3e).

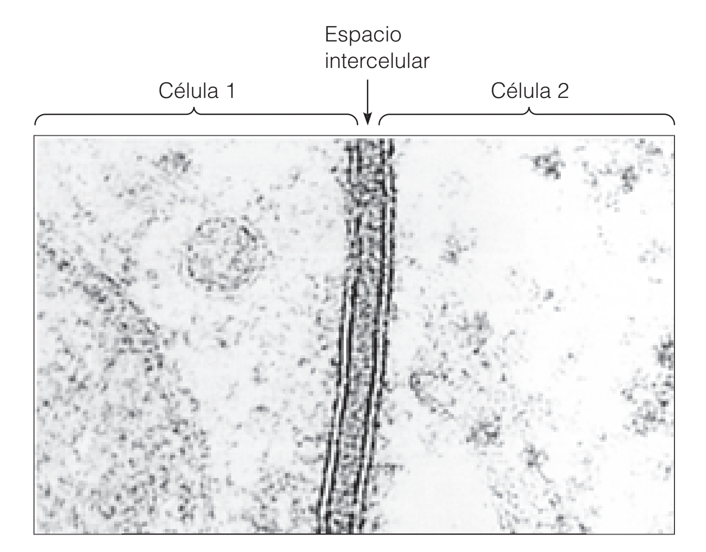


Figura 7.4 Aspecto trilaminar de las membranas celulares. Ésta es una micrografía electrónica de una sección fina entre dos células adyacentes que muestra sus membranas plasmáticas separadas por un espacio intercelular pequeño. Cada membrana aparece como dos líneas oscuras separadas por una zona central teñida ligeramente, un patrón de tinción que le da a la membrana un aspecto trilaminar o de «vía de ferrocarril» (MET).

Cuando se propuso por primera vez, la estructura de la unidad de membrana parecía coincidir extraordinariamente bien con el modelo de Davson y Danielli. Robertson sugirió que el espacio ligeramente teñido (entre las dos líneas oscuras del patrón trilaminar) contenía la región hidrofóbica de las moléculas lipídicas, que no se teñían con facilidad. Por el contrario, se pensó que las dos líneas oscuras, representaban los grupos de las cabezas de los fosfolípidos y que las finas capas de proteínas unidas a la superficie de la membrana, aparecían oscuras debido a su afinidad por la tinción con metales pesados. Esta interpretación parecía proporcionar un apoyo sólido al modelo de Davson y Danielli que proponía que una membrana consiste en una bicapa lipídica recubierta por ambas superficies con finas láminas de proteínas.

Una investigación más detallada reveló los principales defectos del modelo de Davson y Danielli

El modelo de Davson-Danielli, a pesar de su aparente confirmación por microscopía electrónica y su extensión a todas las membranas por Robertson, se empezó a cuestionar, a medida que en la década de 1960 iban surgiendo más datos que no cuadraban con el modelo. Considere, por ejemplo, el problema de las dimensiones de la membrana: si nos basamos en la microscopía electrónica, se ha descrito que la mayoría de las membranas tendrían entre 6 y 8 nm de espesor y de éstos, 4-5 nm corresponderían a la bicapa lipídica. Quedan alrededor de 1-2 nm de espacio en cada superficie de la bicapa para las proteínas de membrana, un espacio que podría acomodarse en el mejor de los casos a una fina monocapa de proteínas formada principalmente por regiones extensas con estructura en lámina β. A medida que las proteínas de membrana se fueron aislando y estudiando, se hizo evidente que la mayoría de ellas eran proteínas globulares con extensas regiones con estructura en α-hélice. Tales proteínas tienen tamaños y formas inconsistentes con el concepto de finas láminas proteicas sobre las dos superficies de la membrana, sugiriendo que deben sobresalir hacia el interior de la membrana.

Una complicación adicional es que el modelo de Davson-Danielli no se ajusta fácilmente a las características distintivas de las diferentes clases de membranas. Dependiendo de su origen, las membranas varían considerablemente en su composición química y especialmente en la proporción de proteínas y lípidos (Tabla 7.1). La *relación proteína/lípido* puede ser tan elevada como 3 o más en algunas células bacterianas y tan bajo como 0,23 para la vaina de mielina que sirve de aislante eléctrico membranoso para los axones nerviosos. Incluso las dos membranas de

Tabla 7.1 Contenido en lípidos, proteínas y carbohidratos de las membranas biológicas

	Porcentaje aproximado en peso			
Membrana	**Proteína**	**Lípido**	**Carbohidratos**	**Índice proteína/lípido**
Membrana plasmática				
Eritrocito humano	49	43	8	1,14
Célula hepática de mamífero	54	36	10	1,50
Ameba	54	42	4	1,29
Vaina de mielina del axón nervioso	18	79	3	0,23
Envoltura nuclear	66	32	2	2,06
Retículo endoplasmático	63	27	10	2,33
Aparato de Golgi	64	26	10	2,46
Tilacoides del cloroplasto	70	30	0	2,33
Membrana mitocondrial externa	55	45	0	1,22
Membrana mitocondrial interna	78	22	0	3,54
Bacterias Gram-positivas	75	25	0	3,00

las mitocondrias difieren de manera significativa: la proporción proteína/lípido es de alrededor de 1,2 para la membrana externa y de cerca de 3,5 para la membrana interna, que contiene todas las enzimas y proteínas relacionadas con el transporte de electrones y la síntesis de ATP. Sin embargo, todas estas membranas parecen la misma cuando se visualizan al microscopio electrónico con la técnica de tinción con osmio de Robertson y colaboradores. A medida que se estudiaban más membranas se hacía cada vez más difícil conciliar la enorme variación existente en el contenido de proteína con el modelo de unidad de membrana, ya que la anchura y apariencia de los «raíles» simplemente no variaba en la misma proporción.

El modelo de Davson-Danielli también se puso en cuestión por estudios en los que las membranas se exponían a *fosfolipasas*, enzimas que degradan los fosfolípidos retirando los grupos de las cabezas. De acuerdo con este modelo, los grupos hidrofílicos de las cabezas de los lípidos de las membranas deberían estar cubiertos por una capa de proteínas y por tanto protegidos de la digestión por las fosfolipasas. Incluso una proporción significativa (por encima del 75% dependiendo del tipo celular) de los fosfolípidos de la membrana de las células se degrada cuando la membrana se expone a las fosfolipasas. Esta susceptibilidad a la digestión enzimática sugirió que muchos de los grupos de las cabezas de los fosfolípidos estarían expuestos en la membrana, en vez de estar cubiertos por una capa de proteína. Además, la localización superficial de las proteínas de membrana especificada por el modelo de Davson-Danielli no estaba basada en los experimentos de los científicos que intentaron aislar esas proteínas. La mayoría de las proteínas de membrana resultaron ser bastante insolubles en agua y sólo podían extraerse con el uso de solventes orgánicos o detergentes. Estas observaciones indicaban que muchas proteínas de membrana son hidrofóbicas (o por lo menos anfipáticas) y sugería que se localizaban, al menos en parte, en el interior hidrofóbico de la membrana más que en cualquiera de sus superficies.

El modelo de Davson-Danielli fue posteriormente desacreditado por la evidencia experimental, se tratará más tarde, indicando que las membranas son estructuras fluidas en las que la mayoría de los lípidos y muchas de las proteínas se mueven libremente en el plano de la membrana. La movilidad de lípidos y proteínas no se ajusta fácilmente a un modelo que imagina láminas de proteínas superficiales unidas por puentes iónicos a la bicapa lipídica subyacente.

Singer y Nicholson: una membrana consiste en un mosaico de proteínas dentro de una bicapa lipídica fluida

Los problemas previos que surgieron con el modelo de Davson-Danielli estimularon el interés para desarrollar nuevas ideas respecto a la organización de las membranas, culminando en 1972 con el **modelo de mosaico fluido** propuesto por S. Jonathan Singer y Garth Nicolson. Este modelo, que ahora domina nuestra visión de la organización de la membrana, tiene dos características principales, las dos aparecen en el nombre. Dicho simplemente, el modelo imagina una membrana como un *mosaico* de proteínas incluidas, o por lo menos unidas, de forma discontinua a una bicapa lipídica *fluida* (Figura 7.3f). En otras palabras, el modelo de Singer-Nicholson mantuvo la estructura de bicapa lipídica básica de modelos previos, pero veía a las proteínas de la membrana de una forma completamente diferente, no como capas finas de proteínas sobre la superficie de la membrana, sino como entidades globulares discretas que se asocian a la membrana basándose en su afinidad relativa por el interior hidrofóbico de la bicapa lipídica (Figura 7.5a).

Singer y Nicholson fueron unos revolucionarios cuando propusieron por primera vez esta forma de pensar en

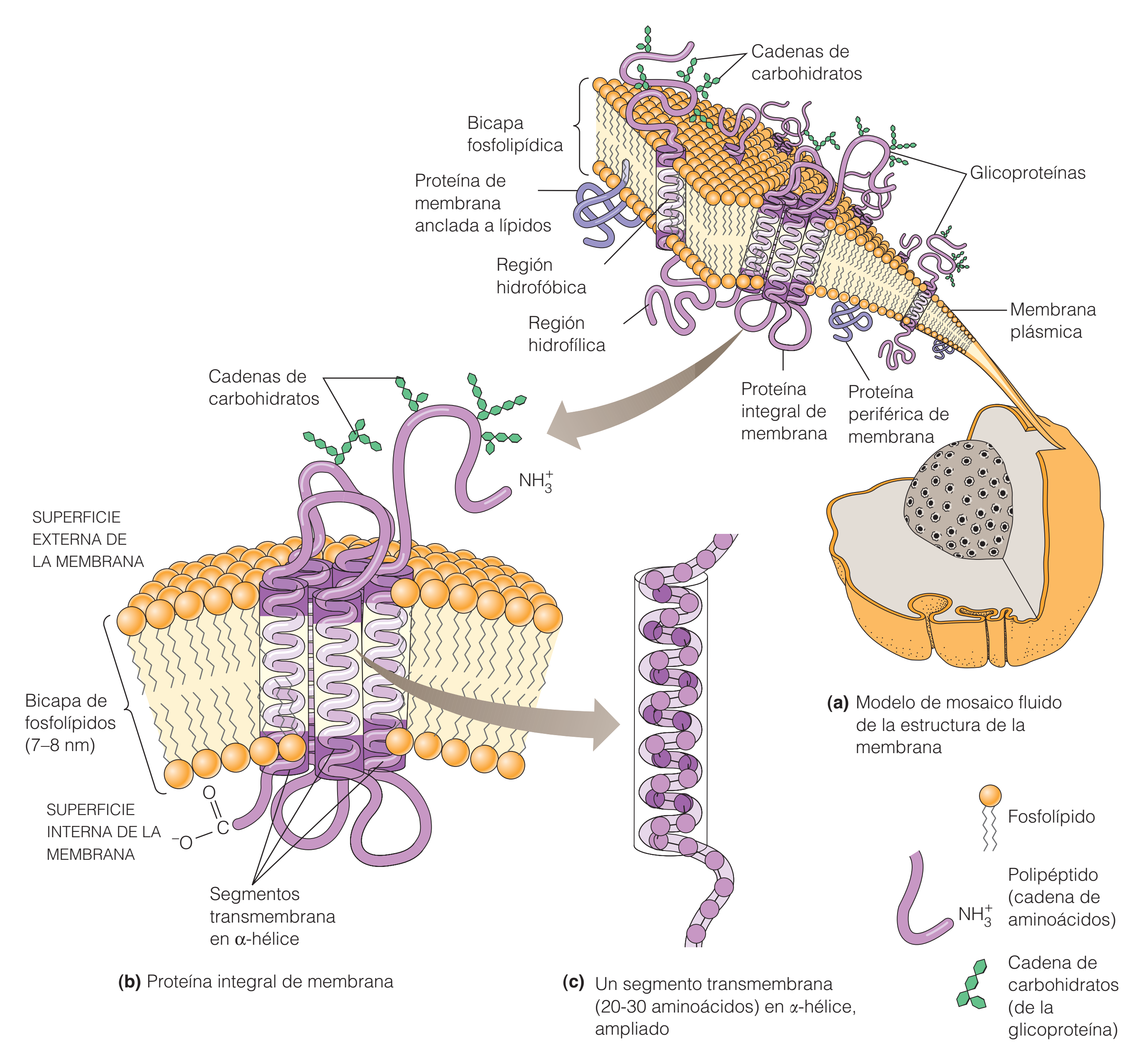


Figura 7.5 El modelo de mosaico fluido de estructura de la membrana. (**a**) Singer y Nicolson imaginaron la membrana como una bicapa de lípidos fluida con un mosaico de proteínas asociadas o bien integrales o bien periféricas. Las proteínas integrales de membrana están ancladas al interior hidrofóbico de la membrana por uno o más segmentos hidrofóbicos transmembrana que normalmente tienen conformación en α-hélice (púrpura claro). Los segmentos hidrofílicos (púrpura oscuro) se extienden hacia el exterior, hacia uno o ambos lados de la membrana. Las proteínas periféricas de membrana se asocian con la superficie de la membrana por fuerzas electrostáticas débiles que las unen a regiones hidrofílicas de otras proteínas integrales de membrana adyacentes o a grupos polares de las cabezas de los fosfolípidos. (**b**) Una proteína integral de membrana con múltiples segmentos transmembrana en α-hélice como se reveló en los trabajos posteriores de Unwin y Henderson. Muchas proteínas integrales de la membrana plasmática tienen orientadas hacia la superficie externa de la membrana, cadenas laterales de carbohidratos unidas a sus segmentos hidrofílicos. (**c**) Un segmento transmembrana en α-hélice con aminoácidos representados por círculos dentro de la hélice.

las proteínas de la membrana, pero resultó que todos los datos cuadraban bastante bien. Basándose en el diferente anclaje a la bicapa, se reconocen tres clases de proteínas de membrana. *Las proteínas integrales de membrana* están embebidas en la bicapa lipídica y se mantienen en su sitio por la afinidad de los segmentos hidrofóbicos de la proteína por el interior hidrofóbico de la bicapa lipídica. Por otro lado, *proteínas periféricas*, que son mucho más hidrofílicas y por tanto están localizadas en la superficie de la membrana, donde están ancladas de forma no covalente a los grupos polares de las cabezas de los fosfolípidos y/o a las partes hidrofílicas de otras proteínas de membrana. *Pro-*

teínas ancladas a lípidos, aunque no son parte del modelo de mosaico fluido original, ahora se reconoce, como una tercera clase de proteínas de membrana. Estas proteínas son esencialmente hidrofílicas y por esto residen en la superficie de la membrana, pero están unidas covalentemente a moléculas de lípido que están incluidas en la bicapa.

La naturaleza fluida de la membrana es la segunda característica crítica del modelo de Singer-Nicholson. La mayoría de los componentes lipídicos de una membrana están en constante movimiento, son capaces de tener movilidad lateral (es decir, movimiento paralelo a la superficie de la membrana) más que de estar bloqueados rígidamente en su sitio. Muchas proteínas de la membrana son también capaces de moverse lateralmente dentro de la membrana, aunque algunas están ancladas a elementos estructurales de uno u otro lado de la membrana y por esto tienen una movilidad restringida.

La fuerza del modelo de mosaico fluido está en que proporciona una explicación fácil para la mayoría de las críticas realizadas al modelo de Davson-Danielli. Por ejemplo, el concepto de proteínas parcialmente embebidas en la bicapa lipídica concuerda con la naturaleza hidrofóbica y la estructura globular de la mayoría de las proteínas de la membrana y elimina la necesidad de acomodar las proteínas de membrana en finas capas superficiales de espesor invariable. Además, la variabilidad de la proporción de proteínas/lípidos de membranas diferentes, simplemente significa que algunas membranas tienen relativamente pocas proteínas embebidas en la bicapa lipídica, mientras que otras membranas tienen más proteínas de este tipo. La exposición de las cabezas de los lípidos en la superficie de la membrana es obviamente compatible con su susceptibilidad a la digestión por las fosfolipasas, mientras que la fluidez de las capas lipídicas y la mezcla de lípidos y proteínas dentro de la membrana hace más fácil imaginar la movilidad tanto de lípidos como de proteínas.

Unwin y Henderson: la mayoría de las proteínas de membrana contienen segmentos transmembrana

La ilustración final en el cronograma (Figura 7.3g) representa una propiedad importante de las proteínas integrales de membrana que los biólogos celulares empezaron a entender en la década de 1970: la mayoría de las proteínas tienen en su estructura primaria una o más secuencias hidrofóbicas que abarcan la bicapa lipídica (Figura 7.5b y c). Estos *segmentos transmembrana* anclan las proteínas a la membrana y las sostienen alineadas correctamente dentro de la bicapa lipídica.

El ejemplo de la Figura 7.3g es de la *bacteriorodopsina*, primera proteína de membrana que se demostró que poseía esta característica estructural. La bacteriorodopsina es una proteína de la membrana plasmática encontrada en una arqueobacteria del género *Halobacterium*, donde su presencia le permite a las células obtener energía directamente de la luz del sol. Para captar esta energía solar, la bacteriorodopsina tiene, como parte de su estructura, una molécula de *retinal*, la misma molécula con capacidad para absorber luz, que utiliza el ojo humano para detectar la luz. Además de absorber la energía luminosa, el retinal provoca un cambio conformacional en la bacteriorodopsina que causa que la proteína bombee protones fuera de la célula. El gradiente de protones resultante a través de la membrana puede ser utilizado como fuente de energía.

Nigel Unwin y Richard Henderson utilizaron la microscopía electrónica para determinar la estructura tridimensional de la bacteriorodopsina y su orientación en la membrana. Su extraordinario descubrimiento, publicado en 1975, fue que la bacteriorodopsina constaba de una única cadena peptídica que se pliega una y otra vez a través de la bicapa lipídica hasta un total de siete veces. Cada uno de los siete segmentos transmembrana de la proteína es una α-hélice empaquetada estrechamente y compuesta principalmente por aminoácidos hidrofóbicos. Los segmentos transmembrana sucesivos están anclados uno a otro por pequeños bucles de aminoácidos hidrofílicos que se extienden y sobresalen desde las superficies polares de la membrana. (Para ver en detalle la estructura tridimensional de la bacteriorodopsina, consulte la Figura 8.14 del capítulo siguiente.) Basándose en los trabajos posteriores realizados por muchos laboratorios, los biólogos de la membrana ahora creen que todas las proteínas transmembrana están ancladas a la bicapa lipídica por uno o más segmentos transmembrana, un tema al que volveremos más tarde en este capítulo.

Descubrimientos recientes mejoran nuestros conocimientos sobre la estructura de la membrana

Casi desde el momento en que Singer y Nicolson lo propusieron, el modelo del mosaico fluido revolucionó la manera en la que los científicos pensaban acerca de la estructura de las membranas. El modelo lanzaba una nueva era en la investigación de la membrana que no sólo ha confirmado el modelo básico, sino que lo ha aumentado y extendido. Además, nuestros conocimientos sobre la estructura de la membrana continúan expandiéndose a medida que nuevos descubrimientos científicos mejoran y modifican el modelo básico.

Descubrimientos recientes enfatizan el concepto de que las membranas no son estructuras homogéneas en las que sus componentes se mezclan de forma libre, sino que tanto los lípidos como las proteínas tienden a ordenarse, estando sus movimientos con frecuencia restringidos por mecanismos difíciles de evidenciar a partir de la estructura básica mostrada en la Figura 7.5. De hecho, la mayoría de los procesos celulares que implican a las membranas, dependen de los complejos estructurales específicos de lípidos y proteínas La señalización celular, un tema del que trataremos en el Capítulo 14, es un ejemplo de este tipo de procesos.

Hasta ahora, para entender los procesos asociados a las membranas, hemos necesitado algo más que el modelo original de mosaico fluido, con lípidos y proteínas flotando alrededor simplemente al azar. No obstante, el modelo de mosaico fluido es básico para entender la estructura de la membrana, de manera que es importante para nosotros examinar en detalle sus características esenciales. Estas características incluyen, la química, la distribución asimétrica y la fluidez de los lípidos de membrana, las relaciones de las proteínas de membrana con la bicapa y la movilidad de las proteínas en la bicapa. Comentaremos cada una de estas características por orden, centrándonos en las evidencias que lo apoyan y en las implicaciones de cada característica en la función de la membrana.

Los lípidos de membrana: la parte «fluida» del modelo

Empezaremos el estudio detallado de las membranas considerando los lípidos, que son componentes importantes de la parte «fluida» del modelo de mosaico fluido.

Las membranas contienen varias de las principales clases de lípidos

Una propiedad evidente del modelo de Singer y Nicholson es que mantiene la bicapa lipídica propuesta inicialmente por Gorter y Grendel, aunque con una mayor diversidad y fluidez de los componentes lipídicos de la que los investigadores anteriores reconocieron. Las principales clases de lípidos de membrana son las siguientes: *fosfolípidos*, *glicolípidos* y *esteroles*. La Figura 7.6 hace un listado de los principales lípidos de cada una de estas categorías y representa la estructura de algunos de ellos.

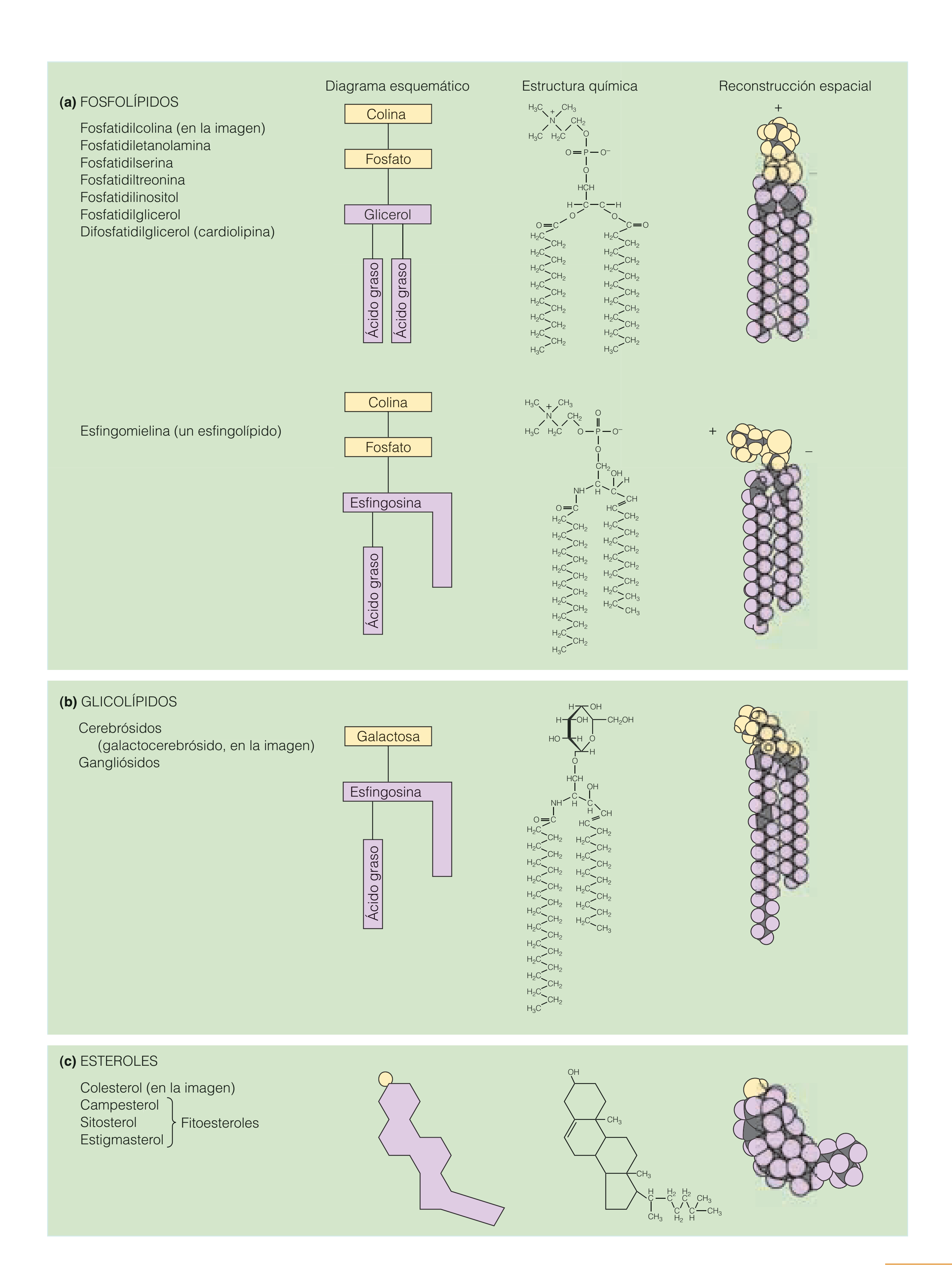
Fosfolípidos. Como ya sabemos desde el Capítulo 3, los lípidos que se encuentran en mayor abundancia en las membranas son los **fosfolípidos** (Figura 7.6a). Las membranas contienen muchas clases de fosfolípidos distintos, incluyendo tanto a **fosfoglicéridos** basados en glicerol como a los **esfingolípidos** basados en esfingosina. Los fosfoglicéridos más comunes son *fosfatidilcolina*, *fosfatidiletanolamina*, *fosfatidilserina* y *fosfatidilinositol*. El esfingolípido más común es la *esfingomielina*, su estructura se muestra en la Figura 7.6a. Las clases, orígenes y proporciones relativas de los fosfolípidos presentes en las membranas varían significativamente dependiendo del origen de éstas (Figura 7.7). Por ejemplo, la esfingomielina es uno de los principales fosfolípidos de las membranas plasmáticas animales, pero está ausente en las membranas plasmáticas de plantas y bacterias y también de las membranas internas de mitocondrias y cloroplastos.

Glicolípidos. Como su nombre indica, los **glicolípidos** se forman al añadir a los lípidos grupos carbohidrato. Algunos glicolípidos tienen como base glicerol, pero la mayoría derivan de la esfingosina y, por tanto, se llaman *glicoesfingolípidos*. Los ejemplos más comunes son los **cerebrósidos** y los **gangliósidos**. Los cerebrósidos se denominan *glicolípidos neutros* ya que cada molécula tiene un azúcar no cargado como grupo principal —galactosa—, en el caso del galactocerebrósido que se muestra en la Figura 7.6b. Por otro lado, un gangliósido, siempre tiene un grupo principal oligosacárido que contiene uno o más residuos de ácido siálico cargados negativamente, que le proporcionan a la molécula carga neta negativa. Los cerebrósidos y los gangliósidos predominan especialmente en las membranas cerebrales y en las células nerviosas. Los gangliósidos expuestos en la superficie de la membrana plasmática también funcionan como antígenos que son reconocidos por anticuerpos en las reacciones inmunes, incluyendo las reacciones responsables de las interacciones entre grupos sanguíneos. Por ejemplo, los grupos sanguíneos humanos ABO, implican a los glicoesfingolípidos que sirven como marcadores de la superficie celular de los glóbulos rojos.

Algunas de las enfermedades humanas más graves se producen como consecuencia de daños en el metabolismo de los glicoesfingolípidos. El ejemplo mejor conocido es la *enfermedad de Tay-Sachs*, que se origina por la ausencia de una enzima lisosomal, la *β*-*N*-acetilhexosaminidasa A, responsable de uno de los pasos de la degradación de los gangliósidos. Como resultado del defecto genético, los gangliósidos se acumulan en el cerebro y en otros tejidos nerviosos, dañando los nervios y afectando a la función cerebral, provocando finalmente parálisis, deterioro mental severo y muerte.

Esteroles. Además de fosfolípidos y glicolípidos, las membranas de la mayoría de las células eucariotas también contienen cantidades significativas de **esteroles** (Figura 7.6c). El principal esterol de las membranas celulares animales es el **colesterol**, mientras que las membranas de las células vegetales contienen pequeñas cantidades de colesterol y

Figura 7.6 (Página opuesta) Tres clases principales de lípidos de membrana. Cada clase de lípido es ilustrado mediante un diagrama esquemático (en la izquierda), su estructura química (en el medio) y mediante modelos de ocupación espacial (en la derecha). (**a**) Los fosfolípidos consisten en una cabeza con un grupo polar pequeño (del tipo colina, etanolamina, serina o inositol) unido a un esqueleto lipídico, formando fosfoglicéridos (basados en glicerol) o esfingolípidos (basados en esfingosina). Para conocer la estructura de colina, etanolamina, serina e inositol, *véase* Figura 3.29 en la p. 69). (**b**) Los glicolípidos están también basados en glicerol o en esfingosina, estos últimos son los más habituales. Un cerebrósido tiene un azúcar neutro, como grupo principal, mientras que un gangliósido tiene una cadena de oligosacárido que contiene uno o más residuos de ácido siálico y además tiene carga negativa. (**c**) Los esteroles más comunes de la membrana son el colesterol en animales y varios fitoesteroles en las plantas.


Diagrama esquemático
Estructura química
Reconstrucción espacial
(a) FOSFOLÍPIDOS
Fosfatidilcolina (en la imagen)
Fosfatidiletanolamina
Fosfatidilserina
Fosfatidiltreonina
Fosfatidilinositol
Fosfatidilglicerol
Difosfatidilglicerol (cardiolipina)
Colina
Fosfato
Glicerol
Ácido graso
Ácido graso
Esfingomielina (un esfingolípido)
Colina
Fosfato
Esfingosina
Ácido graso
(b) GLICOLÍPIDOS
Cerebrósidos
(galactocerebrósido, en la imagen)
Gangliósidos
Galactosa
Esfingosina
Ácido graso
(c) ESTEROLES
Colesterol (en la imagen)
Campesterol
Sitosterol
Estigmasterol
Fitoesteroles

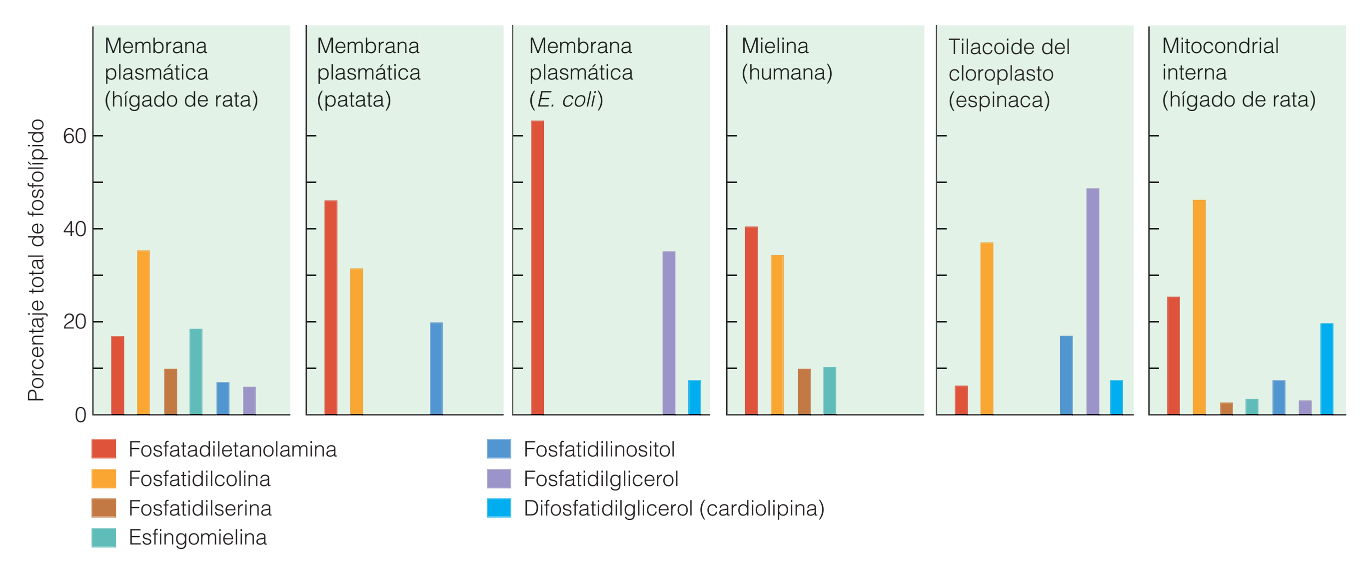


Figura 7.7 Varias clases de membranas y su composición de fosfolípidos. La abundancia relativa de distintas clases de fosfolípidos de las membranas biológicas varía enormemente dependiendo de la membrana de origen.

grandes cantidades de **fitoesteroles**, entre los que se incluyen el campesterol, sitosterol y estigmasterol. Hasta donde se sabe, las membranas de hongos y protistas también contienen esteroles similares en su estructura al colesterol.

No se han encontrado esteroles en las membranas de las células procariotas y también están ausentes de las membranas internas de mitocondrias y cloroplastos, que se cree que derivan evolutivamente de membranas plasmáticas de células procariotas. Sin embargo, la membrana plasmática de por lo menos algunos procariotas, incluyendo tanto bacterias como cianobacterias contienen moléculas similares a los esteroles, denominadas **hopanoides,** que sustituyen a los esteroles en la estructura de la membrana. La molécula de hopanoide es rígida y fuertemente hidrofóbica, con una cadena lateral corta e hidrofílica que se extiende desde uno de los lados (Figura 7.8). Los hopanoides son abundantes en los depósitos de petróleo, sugiriendo que podrían haber sido componentes de las membranas de los antiguos procariotas que contribuyeron, presumiblemente, a la formación de los combustibles fósiles.

La cromatografía en capa fina es una técnica importante para el análisis de los lípidos

¿Cómo sabemos tanto acerca de los componentes lipídicos de las membranas? La respuesta, por supuesto, es que los biólogos y bioquímicos han aislado, separado y estudiado los lípidos de las membranas durante más de un siglo. Una técnica importante para el análisis de los lípidos es la **cromatografía en capa fina** (**TLC**) (del inglés, *thin layer chromatography*), representada esquemáticamente en la Figura 7.9. Esta técnica separa diferentes clases de lípidos basándose en sus afinidades relativas por una *fase estacionaria* hidrofílica y una *fase móvil* hidrofóbica. Normalmente la fase estacionaria es una capa fina de ácido silícico sobre una placa de vidrio o placa metálica, mientras que la fase móvil es una mezcla de solventes apropiados.

En el experimento, lo primero es extraer los lípidos de la preparación de membrana usando una mezcla de solventes orgánicos. Después, se aplica una gota de la mezcla del extracto en un extremo de la placa tratada con ácido silícico, concretamente en un área pequeña denominada el *origen* (Figura 7.9a). Una vez el solvente se ha evaporado, se mete el extremo de la placa en un sistema solvente que normalmente consiste en cloroformo, metanol y agua. A medida que el solvente se mueve, pasa por el origen y asciende por la placa por capilaridad, los lípidos se separan

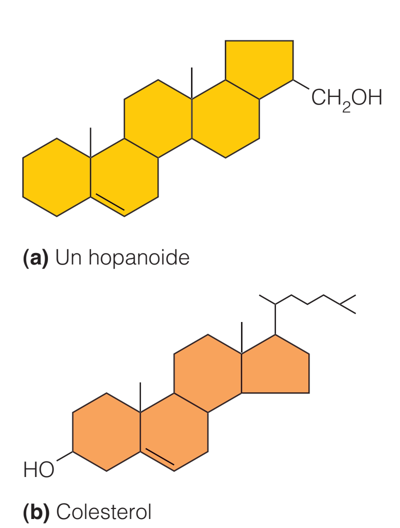


Figura 7.8 Estructura de los hopanoides. (**a**) Un hopanoide, un tipo de molécula similar al colesterol que parece funcionar en las membranas plasmáticas de algunos procariotas, como lo hacen los esteroles en las membranas de las células eucariotas. (**b**) La estructura del colesterol. Una cadena lateral débilmente hidrofílica ($–CH_2OH$ o –OH) sobresale de cada molécula.

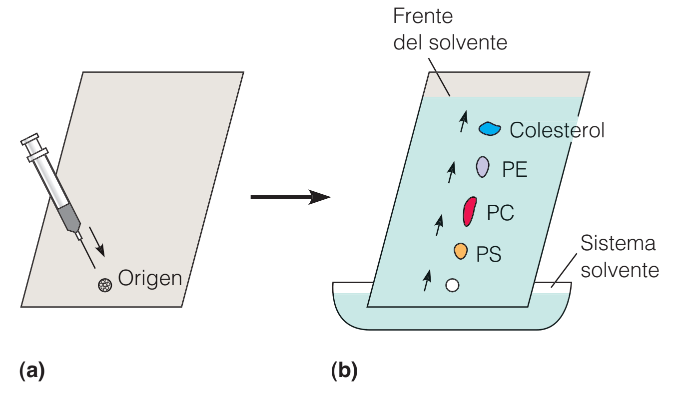


Figura 7.9 Uso de la cromatografía en capa fina para el análisis de los lípidos de membrana. La cromatografía en capa fina (TLC[1]) es una técnica útil para analizar los lípidos de membrana. Los lípidos se extraen a partir de una preparación de membranas con una mezcla de solventes orgánicos y (**a**) se aplica una gota de la muestra en un área pequeña de la placa de vidrio o de la placa de metal tratada con una capa fina de ácido silícico. Cuando la mezcla se ha secado en el punto de origen, la placa se sumerge en un sistema solvente que normalmente está compuesto por una mezcla de cloroformo, metanol y agua. A medida que el solvente asciende por la placa por capilaridad, los lípidos se separan en función de su polaridad: los lípidos no polares como el colesterol no se adhieren con fuerza al ácido silícico y ascienden por la placa, mientras que la mayoría de lípidos polares se mantienen cerca del origen (**b**) cuando el frente del solvente se acerca a la zona superior de la placa, se retira la placa del sistema solvente y cada uno de los lípidos separados se recupera y se identifica. El patrón que se muestra corresponde a la membrana plasmática del eritrocito. Los componentes principales son el colesterol, la fosfatidiletanolamina (PE), la fosfatidilcolina (PC) y la fosfatidilserina (PS).

basándose en su polaridad —es decir, por sus afinidades relativas por las fases estacionaria y móvil—. Los lípidos no polares, como el colesterol, tienen poca afinidad por el ácido silícico (la fase estacionaria) y por tanto ascienden por la placa con el sistema solvente (la fase móvil). Los lípidos más polares, como los fosfolípidos, interactúan fuertemente con el ácido silícico, que ralentiza su movimiento. De esta forma, lípidos diferentes se separan progresivamente a medida que el frente de avance de la fase móvil continúa ascendiendo por la placa. Cuando el frente de avance o *frente del solvente* se acerca a la superficie, la placa se retira del sistema solvente y se seca, y entonces los lípidos separados se recuperan de la placa (disolviendo cada gota individualizada o cada banda en un solvente como el cloroformo) para su posterior identificación y estudio.

La Figura 7.9 muestra el patrón de TLC visto en la membrana plasmática del eritrocito. El componente principal de esta membrana es el colesterol (25%) y los fosfolípidos (55%), con fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC) y fosfatidilserina (PS) como los fosfolípidos más importantes. La membrana plasmática del eritrocito también contiene fosfatidilinositol y esfingolípidos, pero estos componentes están presentes en menores cantidades y es menos probable que se detecten por TLC. No obstante, estos últimos lípidos son componentes importantes de la membrana, que abundan en otros tipos de membranas. Los esfingolípidos, por ejemplo, son especialmente frecuentes en el tejido nervioso, como ya se ha comentado.

Los ácidos grasos son esenciales en la estructura y función de la membrana

Los **ácidos grasos** son componentes de todos los lípidos de la membrana excepto de los esteroles. Son esenciales para la estructura de la membrana debido a que sus largas colas hidrocarbonadas forman una barrera hidrofóbica efectiva para la difusión de los solutos polares. La mayoría de los ácidos grasos de las membranas tienen entre 12 y 20 átomos de carbono de longitud, siendo especialmente frecuentes los ácidos grasos de 16 y 18 átomos de carbono. Este rango de tamaños parece ser el óptimo para la formación de la bicapa, debido a que las cadenas con menos de 12 o con más de 20 átomos de carbono son incapaces de formar una bicapa estable. De esta forma, el espesor de las membranas (alrededor de 6-8 nm, dependiendo de su origen) vendría dictado principalmente por la longitud de la cadena de ácidos grasos necesaria para que la bicapa sea estable.

Los ácidos grasos encontrados en los lípidos de membrana no sólo presentan diferencias en longitud, sino que también varían considerablemente en la presencia y número de dobles enlaces. La Tabla 7.2 muestra las estructuras de diferentes ácidos grasos especialmente frecuentes en los lípidos de membrana. El *ácido palmítico* y el *ácido esteárico* son ácidos grasos saturados con 16 y 18 átomos de carbono respectivamente. El *ácido oleico* y el *ácido linoleico* son ácidos grasos insaturados con uno o dos dobles enlaces respectivamente. Otros ácidos grasos insaturados habituales en las membranas son el *ácido linolénico* con 18 carbonos y tres dobles enlaces y el *ácido araquidónico* con 20 carbonos y cuatro dobles enlaces (*véase* Tabla 3.6). Todos los ácidos grasos insaturados de las membranas están en la configuración *cis* provocando una torsión brusca, un rizo, de la cadena hidrocarbonada en cada doble enlace. Debido a que sus cadenas laterales no son lineales, los ácidos grasos con dobles enlaces no se empaquetan bien en la membrana, característica ésta con considerables implicaciones para la fluidez de la misma, como veremos en breve.

Asimetría de membrana: la mayoría de los lípidos se distribuyen de manera desigual entre las dos monocapas

Puesto que las membranas contienen muchas clases de lípidos diferentes, la pregunta que surge es si los diferentes lípidos se distribuyen o no, al azar, entre las dos monocapas de lípidos que constituyen una bicapa lipídica. Estudios químicos que incluyen membranas derivadas de una

[1] *N. del T.:* TLC de Thin Layer Cromatography.

Tabla 7.2 Estructura de algunos ácidos grasos comunes encontrados en las bicapas lipídicas

Nombre del ácido graso	Número de átomos de carbono	Número de dobles enlaces	Fórmula estructural	Reconstrucción espacial
Palmitato saturado	16	0	$^{-}O-C(=O)-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$	
Estearato	18	0	$^{-}O-C(=O)-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$	
Oleato insaturado	18	1	$^{-}O-C(=O)-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-C(H)=C(H)-CH_2-CH_2-H_2C-CH_2-H_2C-CH_2-H_2C-CH_3$	
Linoleato	18	2	$^{-}O-C(=O)-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-C(H)=C(H)-CH_2-C(H)=C(H)-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$	

amplia variedad de tipos celulares diferentes revelaron que la mayoría de los lípidos se distribuyen de forma desigual entre las dos monocapas. Esta **asimetría de la membrana** incluye diferencias tanto en las clases de lípidos presentes como en el grado de instauración de los ácidos grasos de las moléculas de fosfolípidos. Por ejemplo, la mayoría de los glicolípidos presentes en la membrana plasmática de una célula animal —y también la mayoría de las glicoproteínas— se restringe a la más externa de las dos monocapas. El resultado es, que sus grupos carbohidrato sobresalen de la superficie de la membrana externa, en donde están implicados en una gran variedad de acontecimientos relacionados con la señalización y el reconocimiento. Por otro lado, la fosfatidiletanolamina, el fosfatidilinositol y la fosfatidilserina son más importantes en la monocapa interna, donde están implicados en la transmisión de varios tipos de señales desde la membrana plasmática hacia el interior de la célula. Nos esperan más detalles sobre la detección de señales y la transducción en el Capítulo 14.

La asimetría de la membrana se establece durante su biogénesis por la inserción de diferentes lípidos o por la existencia de proporciones diferentes de varios lípidos en cada una de las dos monocapas. Una vez establecida, la asimetría tiende a mantenerse debido a que el movimiento de los lípidos de una monocapa a la otra requiere que los grupos hidrofílicos de sus cabezas pasen a través del interior hidrofóbico de la membrana, un acontecimiento que es desfavorable termodinámicamente. Aunque ocurre de manera ocasional, este «flip-flop», o **difusión transversa** de los lípidos de membrana, es relativamente raro. De hecho, una molécula de fosfolípido típica experimenta el flip-flop menos de una vez a la semana en una bicapa fosfolipídica pura. Esto contrasta notablemente con la **rotación** de las moléculas de fosfolípido alrededor de su eje y con la **difusión lateral** de los fosfolípidos en el plano de la membrana, movimientos que ocurren libremente, de forma rápida y al azar. La Figura 7.10 ilustra estos tres tipos de movimientos lipídicos.

Mientras que el flip-flop fosfolipídico es relativamente raro, su frecuencia es mayor en las membranas naturales que en las bicapas lipídicas artificiales ya que algunas membranas —la del retículo endoplasmático liso (ER), en particular— tienen proteínas denominadas **translocadores lipídicos**, o **flipasas**, que catalizan el flip-flop de los lípidos de membrana de una monocapa a la otra. Estas proteínas actúan sólo sobre clases específicas de lípidos. Por ejemplo, una de estas proteínas en la membrana del retículo endoplasmático liso, cataliza la translocación de fosfatidilcolina de un lado de la membrana al otro pero no reconoce a otros fosfolípidos. Esta capacidad para mover moléculas lipídicas selectivamente de un lado de la bicapa al otro es una contribución más a la distribución asimétrica de los fosfolípidos a través de la membrana. El papel del retículo endoplasmático liso en la síntesis y flip-flop selectivo de los fosfolípidos de la membrana es un tema al que volveremos en el Capítulo 12.

La bicapa lipídica es fluida

Una de las propiedades más llamativas de los lípidos de membrana es que más que tener un sitio fijo en la membrana, forman una bicapa fluida que permite la difusión lateral tanto de los lípidos como de las proteínas en la membrana. Las moléculas lipídicas se mueven especialmente rápido debido a que son mucho más pequeñas que las proteínas. Por ejemplo, una molécula fosfolipídica típica, tiene un peso molecular de alrededor de 800 y puede viajar la longitud de una célula bacteriana (en la mayoría de los casos, unas pocas micras) en un segundo o menos. Las proteínas se mueven mucho más lentamente que los lípidos, en parte porque son moléculas mucho mayores, con pesos moleculares varias veces superiores a los de los fosfolípidos, pero principalmente debido a sus interacciones con las proteínas del citoesqueleto del interior de la célula.

La difusión lateral de los lípidos de membrana se puede demostrar experimentalmente por una técnica denomi-

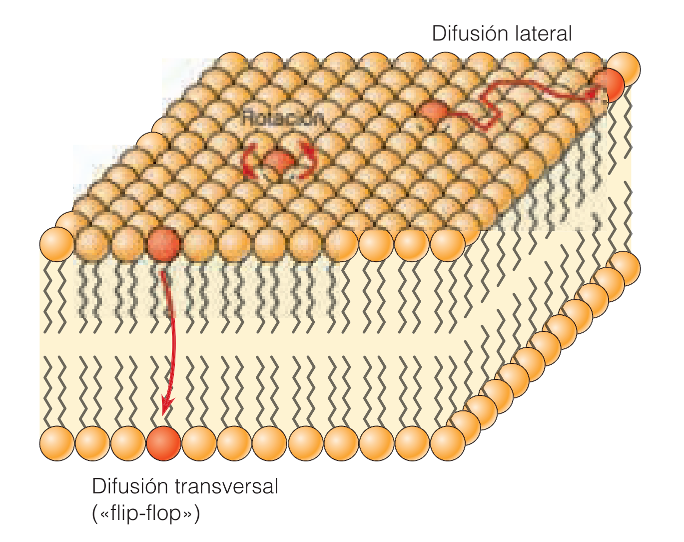


Figura 7.10 Movimientos de las moléculas de fosfolípido en las membranas. Una molécula de fosfolípido es capaz de realizar tres clases de movimientos en la membrana; rotación alrededor de su eje mayor; difusión lateral al azar intercambiando sitios con moléculas vecinas de la misma monocapa; difusión transversal o «flip-flop», de una monocapa a la otra. A 37 °C en una monocapa de fosfolípidos pura, una molécula lipídica típica intercambia su sitio con moléculas vecinas, unos diez millones de veces por segundo y se mueve lateralmente a una velocidad de varias micras por segundo. Por el contrario, la frecuencia con la que una molécula de fosfolípido individual difunde por flip-flop de una capa a la otra, oscila, entre menos de una vez a la semana en una bicapa fosfolipídica pura, a una vez cada pocas horas en algunas membranas naturales. Esta última diferencia, se debe, a la presencia en algunas membranas, de enzimas denominadas translocadores fosfolipídicos, o flipasas, que catalizan la difusión transversal de moléculas de fosfolípido de una monocapa a la otra.

nada **recuperación de la fluorescencia después de fotoblanqueamiento** (Figura 7.11). El investigador etiqueta, o *marca*, las moléculas lipídicas de la membrana de una célula viva uniéndolas covalentemente a moléculas de un marcador fluorescente. Se utiliza entonces un rayo láser de alta intensidad que blanquea el colorante en un punto pequeño (unas pocas micras cuadradas) de la superficie celular. Si se examina la superficie celular inmediatamente después con un microscopio de fluorescencia, se observará en la membrana, un punto oscuro, no fluorescente. Sin embargo, unos segundos después los extremos del punto se vuelven fluorescentes, ya que moléculas lipídicas blanqueadas difunden fuera del área tratada con el láser y moléculas lipídicas fluorescentes, procedentes de regiones adyacentes de la membrana, penetran en ella. Finalmente, el punto es indistinguible del resto de la superficie celular. Esta técnica no sólo demuestra que los lípidos de membrana están en un estado fluido más que en un estado estático, sino que proporciona una manera directa de medir el movimiento lateral de moléculas específicas.

Las membranas funcionan correctamente sólo en estado fluido

Como puede suponer, la fluidez de la membrana cambia con la temperatura, disminuyendo a medida que la temperatura decae y aumentando a medida que la temperatura crece. De hecho, a partir de estudios realizados con bicapas lipídicas artificiales, se sabe que cada bicapa lipídica tiene una **temperatura de transición** característica (T_m) para la cual se gelifica («se congela») cuando se enfría y se hace otra vez fluida («se funde») cuando se calienta. Este cambio en el estado de la membrana se denomina **transición de fase** y es en cierta medida similar al cambio que experimentan la mantequilla o la margarina al calentarlas o enfriarlas. Para que una membrana funcione correctamente debe mantenerse en el estado fluido —es decir, a una temperatura por encima de su valor de T_m—. A una temperatura por debajo del valor de T_m, todas las funciones que dependen de la movilidad o del cambio conformacional de las proteínas de membranas se verán dañadas o interrumpidas, incluyendo procesos vitales tales como el transporte de solutos a través de la membrana, la detección y la transmisión de señales, y la comunicación intercelular (consulte la Figura 7.2).

La técnica de **calorimetría diferencial de barrido** permite determinar la temperatura de transición de una membrana dada. Este procedimiento monitoriza la absorción de calor que se produce durante la transición desde un estado físico a otro —la transición del estado de gel al estado fluido— en el caso de las membranas. La membrana de interés se sitúa en una cámara sellada, el *calorímetro*, y la absorción de calor se mide a medida que se va aumentando lentamente la temperatura. El punto de máxima absorción de calor corresponde a la temperatura de transición (Figura 7.12a).

Los efectos de la composición de ácidos grasos en la fluidez de la membrana. La fluidez de la membrana depende principalmente de las clases de lípidos que contiene. Hay dos propiedades del componente lipídico de una membrana que resultan especialmente importantes para determinar su fluidez: la longitud de las cadenas laterales de los ácidos grasos y su grado de instauración (es decir, el número de dobles enlaces presentes). Los ácidos grasos de cadena larga tienen temperaturas de transición más elevadas que los ácidos grasos de cadenas cortas, lo que indica que las membranas ricas en ácidos grasos de cadena larga tienden

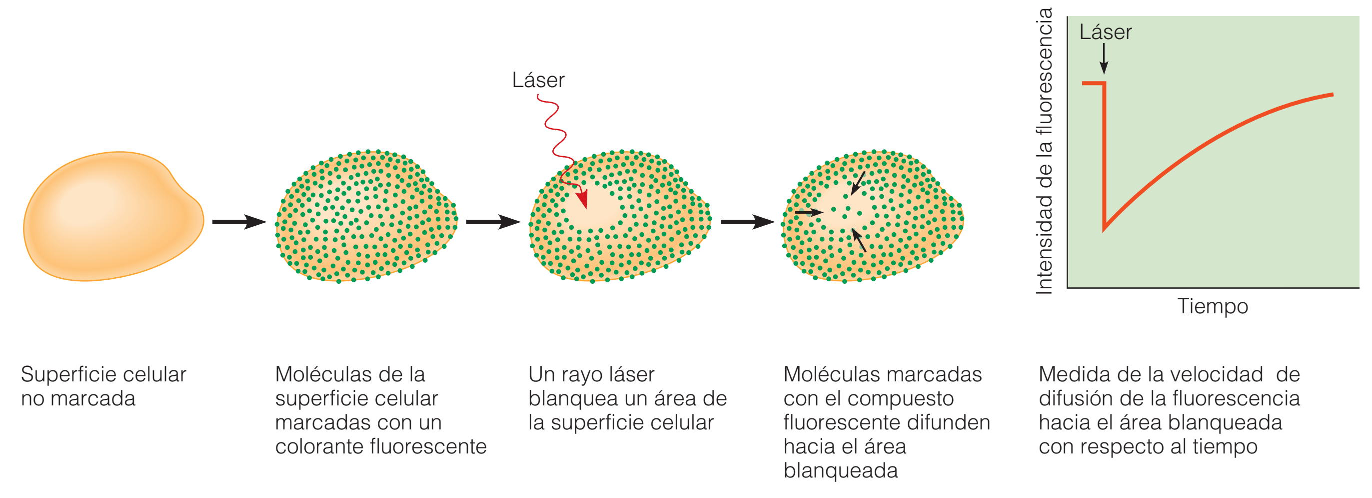
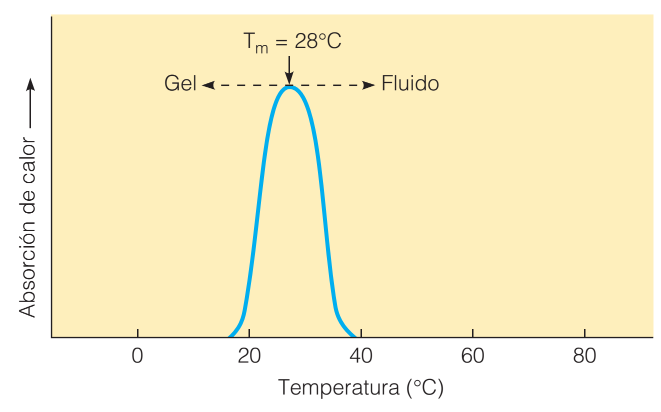
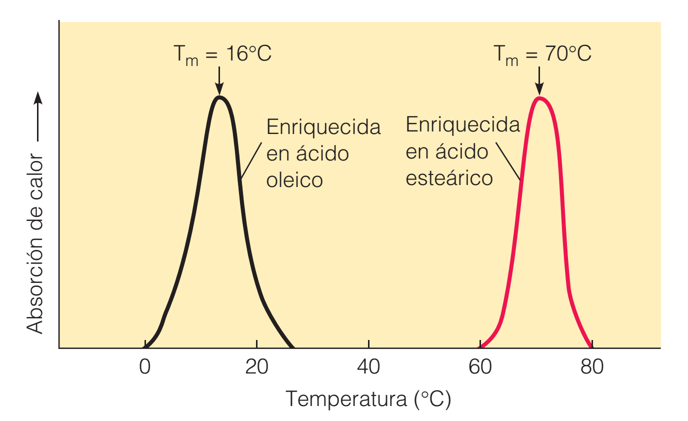


Figura 7.11 Medida de la movilidad lipídica en la membrana por recuperación de la fluorescencia después de fotoblanqueamiento. Los lípidos de membrana se marcan con un compuesto fluorescente, y en una zona localizada de la membrana esa fluorescencia se blanquea irradiando la célula con un rayo láser. La fluidez de la membrana se mide determinando la velocidad a la que difunden moléculas fluorescentes desde zonas cercanas al área blanqueada, provocando así la reaparición de la fluorescencia en el punto blanqueado por el láser. Se han realizado experimentos similares con proteínas de membrana; *véase* la Figura 7.28.



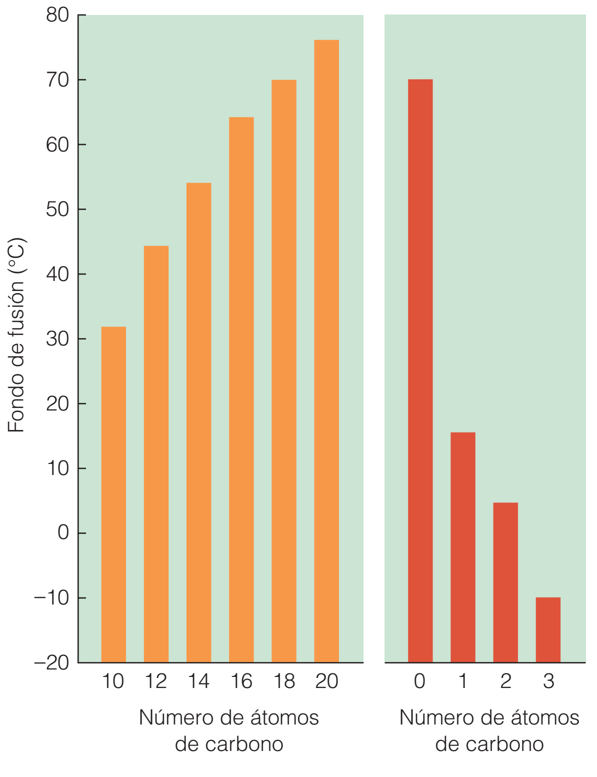
(a) Membrana normal



(b) Membrana enriquecida con ácido oleico o con ácido esteárico

Figura 7.12 Determinación de la temperatura de transición de la membrana por calorimetría diferencial de barrido. (**a**) Cuando la temperatura de una preparación de membrana se aumenta lentamente en una cámara de calorimetría, la temperatura de transición (T_m) del estado gel al estado fluido viene marcada por un pico de absorción de calor. (**b**) Las membranas celulares que crecen en un medio enriquecido con ácido oleico, un ácido graso insaturado, son más fluidas que las membranas normales y por tanto tienen una menor temperatura de transición. Las membranas de las células que crecen en medios enriquecidos con ácido esteárico, un ácido graso saturado, son menos fluidas que las membranas normales y por tanto tienen una temperatura de transición más alta.

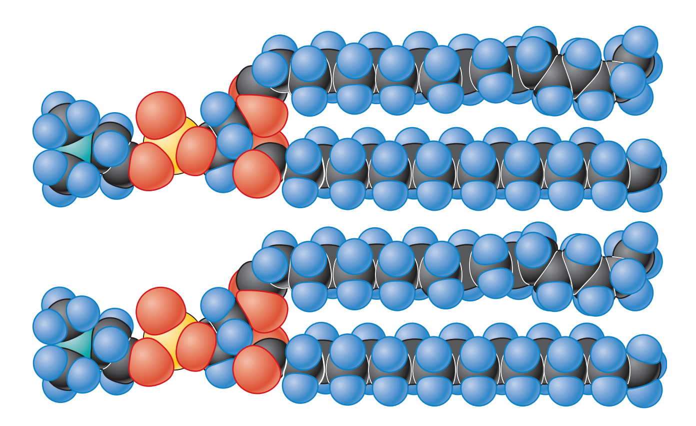
a ser menos fluidas. Por ejemplo, a medida que la longitud de la cadena de los ácidos grasos saturados aumenta de 10 a 20 átomos de carbono, los puntos de fusión aumentan de 32 °C a 76 °C y por tanto, de manera progresiva, la membrana se vuelve menos fluida (Figura 7.13a). La presencia de instauraciones afecta considerablemente al punto de fusión. Para ácidos grasos con 18 átomos de carbono, los puntos de fusión son 70, 16, 5 y -11 °C para cero, uno, dos y tres dobles enlaces, respectivamente (Figura 7.13b). En consecuencia, las membranas que contienen muchos ácidos grasos insaturados tienden a tener temperaturas de transición más bajas y además son más fluidas que las membranas con muchos ácidos grasos saturados. La Figura 7.12b ilustra este aumento de fluidez en membranas ricas en ácido oleico (18 carbonos y un doble enlace) frente a membranas enriquecidas con ácido esteárico (18 carbonos saturados).



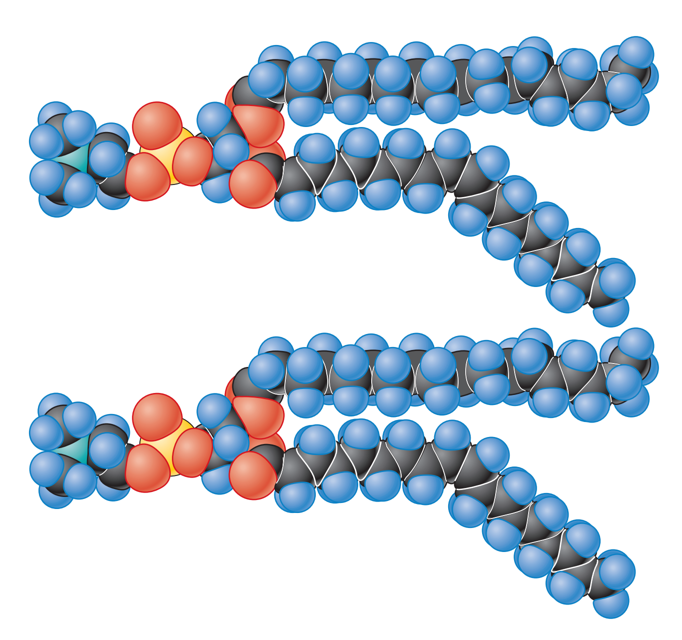
(a) Efecto de la longitud de la cadena en el punto de fusión
(b) Efecto de la instauración en el punto de fusión

Figura 7.13 Efecto de la longitud de la cadena y el número de dobles enlaces en la temperatura de fusión de los ácidos grasos. El punto de fusión de los ácidos grasos (**a**) aumenta con la longitud de la cadena para los ácidos grasos saturados y (**b**) disminuye dramáticamente con el número de dobles enlaces para ácidos grasos con una longitud de cadena fija. La parte (**b**) muestra datos para los ácidos grasos de 18 carbonos, ácidos esteárico, oleico, linoleico y linolénico con 0, 1, 2 y 3 dobles enlaces, respectivamente.

El efecto de la instauración en la fluidez de la membrana es tan drástico debido a que los giros que los dobles enlaces introducen en los ácidos grasos evitan que las cadenas hidrocarbonadas encajen. Los lípidos de membrana con ácidos grasos saturados están bien empaquetados (Figura 7.14a), mientras que los lípidos con ácidos grasos insaturados, no (Figura 7.14b). Los lípidos de la mayoría de las membranas plasmáticas contienen ácidos grasos que varían tanto en la longitud de la cadena como en el grado de instauración. De hecho, la variabilidad es a menudo intramolecular, ya que los lípidos de membrana contienen normalmente un ácido graso saturado y un ácido graso insaturado. Esta propiedad ayuda a asegurar que las membranas estén en estado fluido a temperaturas fisiológicas.



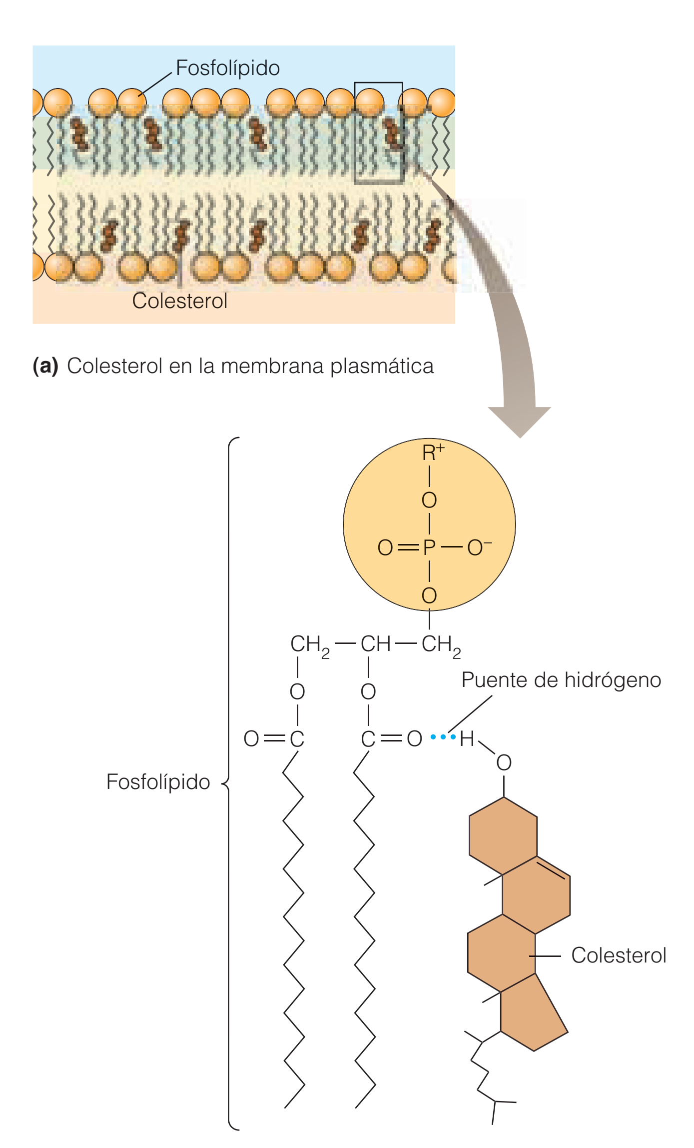
(a) Lípidos con ácidos grasos saturados encajan bien en la membrana



(b) Lípidos con una mezcla de ácidos grasos saturados e insaturados no encajan bien en la membrana

Figura 7.14 El efecto de los ácidos grasos insaturados en el empaquetamiento de los lípidos de membrana. (**a**) Los fosfolípidos de membrana con ácidos grasos saturados encajan estrechamente debido a que las cadenas de ácidos grasos discurren paralelas unas a otras. (**b**) Los lípidos de membrana con uno o más ácidos grasos insaturados no encajan tan estrechamente debido a que los dobles enlaces en *cis* provocan torsiones en las cadenas, que interfieren con el empaquetamiento. Cada una de las estructuras mostradas es una molécula de fosfatidilcolina, con dos ácidos grasos de 18 carbonos saturados (ácido esteárico) (parte a) o dos ácidos grasos de 18 carbonos, uno de ellos saturado (ácido esteárico) y el otro con un doble enlace (ácido oleico) (parte b).

Los efectos de los esteroles sobre la fluidez de la membrana. En las células eucariotas, la presencia de esteroles —principalmente colesterol en las membranas de células animales y fitoesteroles en las membranas de células vegetales— afecta a la fluidez de la membrana. Los esteroles son los componentes principales de las membranas de muchos tipos celulares. Una célula animal típica, por ejemplo, contiene grandes cantidades de colesterol —por encima del 50% del total de los lípidos de membrana en base molar—. Normalmente las moléculas de colesterol se encuentran en las dos capas de la membrana plasmática, pero una molécula dada se localiza en una de las dos capas (Figura 7.15a). La molécula se orienta en la capa con su



(b) Bonding of cholesterol to phospholipid

Figura 7.15 Orientación de las moléculas de colesterol en una bicapa lipídica. (**a**) Las moléculas de colesterol están presentes en ambas capas de las membrana plasmática de la mayoría de las células animales, pero una molécula dada se localiza en una de las dos capas. (**b**) Cada molécula se orienta en la capa lipídica de tal forma que su un único grupo hidroxilo se sitúa cerca del grupo polar de la cabeza de una molécula de fosfolípido vecina, para que forme un puente de hidrógeno con el oxígeno de un enlace éster entre el esqueleto de glicerol y el ácido graso. El anillo esteroide y la cadena lateral hidrocarbonada de la molécula de colesterol interactúan con cadenas hidrocarbonadas adyacentes de los fosfolípidos de la membrana.

único grupo hidroxilo —la única parte polar de una molécula hidrofóbica— cerca del grupo polar de la cabeza de una molécula de fosfolípido vecino, donde puede formar un puente de hidrógeno con el oxígeno de un enlace éster del esqueleto de glicerol y un ácido graso de la molécula de fosfolípido (Figura 7.15b). Los anillos de esteroides hidrofóbicos rígidos y la cadena lateral hidrocarbonada de la molécula de colesterol interactúan con porciones de las cadenas hidrocarbonadas adyacentes que están más cerca de las cabezas de los fosfolípidos.

Intercalar moléculas rígidas de colesterol en la membrana de una célula animal hace que a temperaturas más elevadas la membrana sea menos fluida de lo que debería ser. Sin embargo, el colesterol también evita de manera eficaz que las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos encajen a medida que la temperatura va disminuyendo, reduciendo de este modo, la tendencia de las membranas a gelificarse al enfriarse. Además, el colesterol tiene el efecto paradójico de *disminuir* la fluidez de la membrana a temperaturas por encima de la T_m y a *aumentarla* a temperaturas por debajo de la T_m. Los esteroles de las membranas de otros eucariotas presumiblemente funcionan de la misma manera.

Además de sus efectos sobre la fluidez de la membrana, los esteroles también disminuyen la permeabilidad de una bicapa lipídica a los iones y a pequeñas moléculas polares. Probablemente lo hacen, rellenando los espacios entre las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos de las membranas, tapando de esta forma pequeños canales a través de los cuales podrían pasar iones y pequeñas moléculas. En general, una bicapa lipídica que contiene esteroles es menos permeable a los iones y a moléculas pequeñas que una bicapa que carece de esteroles.

La mayoría de los organismos pueden regular la fluidez de la membrana

La mayoría de los organismos, tanto procariotas como eucariotas, son capaces de regular la fluidez de la membrana, principalmente cambiando la composición lipídica de las mismas. Esta habilidad es especialmente importante en los *poiquilotermos* —organismos como bacterias, hongos, protistas, plantas y animales «de sangre fría» que no pueden regular su propia temperatura—. Ya que la fluidez lipídica disminuye a medida que la temperatura desciende, las membranas de estos organismos se gelificarían con el enfriamiento si el organismo no tuviera manera de compensar los descensos de la temperatura ambiente. (Usted puede haber experimentado este efecto aunque sea un *homeotermo*, u organismo «de sangre caliente»: en los días fríos, sus dedos de las manos y de los pies pueden estar tan fríos que las membranas de las terminaciones nerviosas sensitivas dejan de funcionar quedando temporalmente entumecidos.) Por otro lado, a elevadas temperaturas, las bicapas lipídicas de los poiquilotermos se hacen tan fluidas que ya no funcionan como una barrera de permeabilidad eficaz. Por ejemplo, la mayoría de los animales de sangre fría se paralizan a temperaturas superiores a 45 °C, debido probablemente a que las membranas de las células nerviosas se vuelven tan permeables a los iones que los gradientes iónicos no se mantienen y de forma global se impide la función nerviosa.

Afortunadamente la mayoría de los poiquilotermos pueden compensar los cambios de temperatura alterando la composición lipídica de sus membranas, regulando de ese modo la fluidez de la misma. Esta capacidad se denomina **adaptación homeoviscosa** debido a que el efecto principal de esa regulación es mantener la viscosidad de la membrana aproximadamente igual a pesar de las variaciones de temperatura. Considere, por ejemplo, qué pasa cuando las células bacterianas se transfieren de un medio ambiente cálido a otro más frío. En algunas especies del género *Micrococcus*, un pequeño aumento en la temperatura desencadena un aumento en una proporción de ácidos grasos de 16 carbonos frente a ácidos grasos de 18 carbonos en la membrana plasmática, que ayuda a la célula a mantener la fluidez de la membrana (recuerde que la presencia de cadenas de ácidos grasos más cortas aumenta la fluidez de la membrana porque disminuye la temperatura de fusión).

En este caso particular, el aumento de fluidez de membrana deseado, se alcanza activando una enzima que retira dos carbonos terminales de las colas hidrocarbonadas de 18 átomos de carbono. En otras especies bacterianas, la adaptación a la temperatura ambiente implica una alteración en el grado de instauración de los ácidos grasos, más que en su longitud. Por ejemplo, en la bacteria intestinal común *Escherichia coli*, un descenso en la temperatura ambiental desencadena la síntesis de una enzima *desaturasa* que introduce dobles enlaces en las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos. Como estos ácidos grasos insaturados se incorporan en los fosfolípidos de membrana, disminuyen la temperatura de transición de la misma, asegurando de esta forma que la membrana se mantenga fluida a una temperatura más baja.

La adaptación homeoviscosa también se produce en levaduras y en plantas. En estos organismos los cambios de fluidez de la membrana relacionados con la temperatura parecen depender del aumento de solubilidad del oxígeno en el citoplasma a temperaturas más bajas. El oxígeno es un sustrato para el sistema de la enzima desaturasa implicado en la generación de ácidos grasos insaturados. Con más oxígeno disponible a temperaturas más bajas, los ácidos grasos se sintetizan en mayor proporción y la fluidez de la membrana aumenta compensando además el efecto de la temperatura. Esta capacidad tiene un efecto significativo en la agricultura ya que las plantas que se pueden adaptar de esta forma, son resistentes al frío (resistentes al enfriamiento) y pueden crecer en ambientes más fríos. Los animales poiquilotermos como los anfibios y reptiles tam-

bién se adaptan a temperaturas más bajas aumentando la proporción de ácidos grasos insaturados en sus membranas. Además, estos organismos pueden aumentar la proporción de colesterol en la membrana, disminuyendo las interacciones entre las cadenas hidrocarbonadas y reduciendo la tendencia de la membrana a gelificarse.

En general, aunque la adaptación homeoviscosa es de mucha más relevancia para los organismos poiquilotermos, también es importante en los mamíferos que hibernan ya que, a menudo, la temperatura corporal decae sustancialmente a medida que un animal entra en hibernación —un descenso de más de 30 °C para algunos roedores—. Un animal que entra en hibernación se adapta a este cambio incorporando una mayor proporción de ácidos grasos insaturados en los fosfolípidos de la membrana a medida que su temperatura corporal decae.

Las balsas lipídicas son regiones concretas de lípidos de membrana que están implicadas en la señalización celular

Hasta hace poco, el componente lipídico de una membrana se consideraba que era uniformemente fluido y relativamente homogéneo dentro de una monocapa dada, y se suponía que las proteínas proporcionaban las características estructurales principales de la membrana. Sin embargo, en pocos años, un descubrimiento ha generado mucha expectación, la existencia de regiones de lípidos de membrana que secuestran proteínas implicadas en la señalización celular. Estas regiones se denominan *microdominios*, o más popularmente **balsas lipídicas**, término generalmente acuñado por los biólogos celulares, que estudian el transporte lipídico intracelular. Las balsas lipídicas se identificaron por primera vez en la monocapa externa de la membrana plasmática de las células eucariotas pero también se han detectado en las monocapas internas.

Las balsas lipídicas de las monocapas externas de las membranas se caracterizan por tener niveles elevados de colesterol y glicoesfingolípidos. Los esfingolípidos tienen colas de ácidos grasos más largas y más saturadas que la mayoría de los lípidos de membrana. Además, los fosfolípidos presentes en las balsas lipídicas están mucho más saturados que los que están situados en la membrana que las rodea. Estas propiedades, además de la rigidez y de la naturaleza hidrofóbica del colesterol, permiten el buen empaquetamiento del colesterol y de las colas hidrocarbonadas de glicoesfingolípidos y fosfolípidos. El resultado es que, las balsas lipídicas son más espesas y menos fluidas que el resto de la membrana, permitiendo así su identificación como microdominios lipídicos diferenciados. Las *caveolas* están estrechamente relacionadas con las balsas lipídicas tanto en estructura como quizás en función. Las caveolas son pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática con forma de frasco que están cubiertas por *caveolina*, proteína de unión al colesterol, y que se considera como un subgrupo de balsa lipídica. Mucha de la expectación que se ha generado alrededor de las balsas de lípidos y de las caveolas está relacionada con su papel en la detección y respuesta a señales químicas que afectan a las células desde el exterior, un tema que consideraremos en detalle cuando lleguemos al Capítulo 14. Por el momento, simplemente prestaremos atención a las diferentes proteínas receptoras implicadas en la detección de señales químicas que están localizadas en la monocapa lipídica externa de la membrana plasmática (revisión en la Figura 7.2, la función 4). Cuando se unen a sus ligandos específicos, ciertos receptores se mueven hacia balsas lipídicas concretas que también están localizadas en la monocapa externa. Se cree que las balsas lipídicas que en la monocapa externa contienen receptores están acopladas funcionalmente a balsas lipídicas de la monocapa interna. Estas balsas lipídicas contienen *quinasas* específicas, enzimas que generan segundos mensajeros dentro de la célula, catalizando la fosforilación de sustancias específicas. De esta forma, señales detectadas por las proteínas receptoras en la monocapa externa se transmiten al interior de la célula por los nexos funcionales existentes entre las balsas lipídicas de las dos monocapas de membrana.

Proteínas de membrana: la parte «mosaico» del modelo

Después de observar en detalle el aspecto «fluido» del modelo del mosaico fluido, vamos ahora a la parte del «mosaico». Esto puede incluir a las balsas lipídicas y a otros dominios lipídicos, pero los principales componentes del mosaico de membrana son las proteínas de membrana, como inicialmente imaginaron Singer y Nicolson. Primero veremos las evidencias con las que los microscopistas estipularon que la membrana era un mosaico de proteínas y después consideraremos las clases principales de proteínas de membrana.

La membrana consiste en un mosaico de proteínas: evidencias de microscopía con criofractura

Los indicios más sólidos sobre el modelo de mosaico fluido procedían de estudios realizados con bicapas artificiales y con membranas naturales preparadas para microscopía electrónica con **criofractura**. En esta técnica, una bicapa lipídica o una membrana (o una célula que contuviera membranas) se congela rápidamente y después se golpea bruscamente con una cuchilla de diamante. A menudo, la fractura resultante sigue el plano entre las dos capas de lípidos de membrana, debido a que el interior no polar de la bicapa es la vía de menor resistencia de la muestra congelada. Como resultado, la bicapa se escinde en sus monocapas interna y externa, revelando la superficie interna de cada una de ellas (Figura 7.16a).

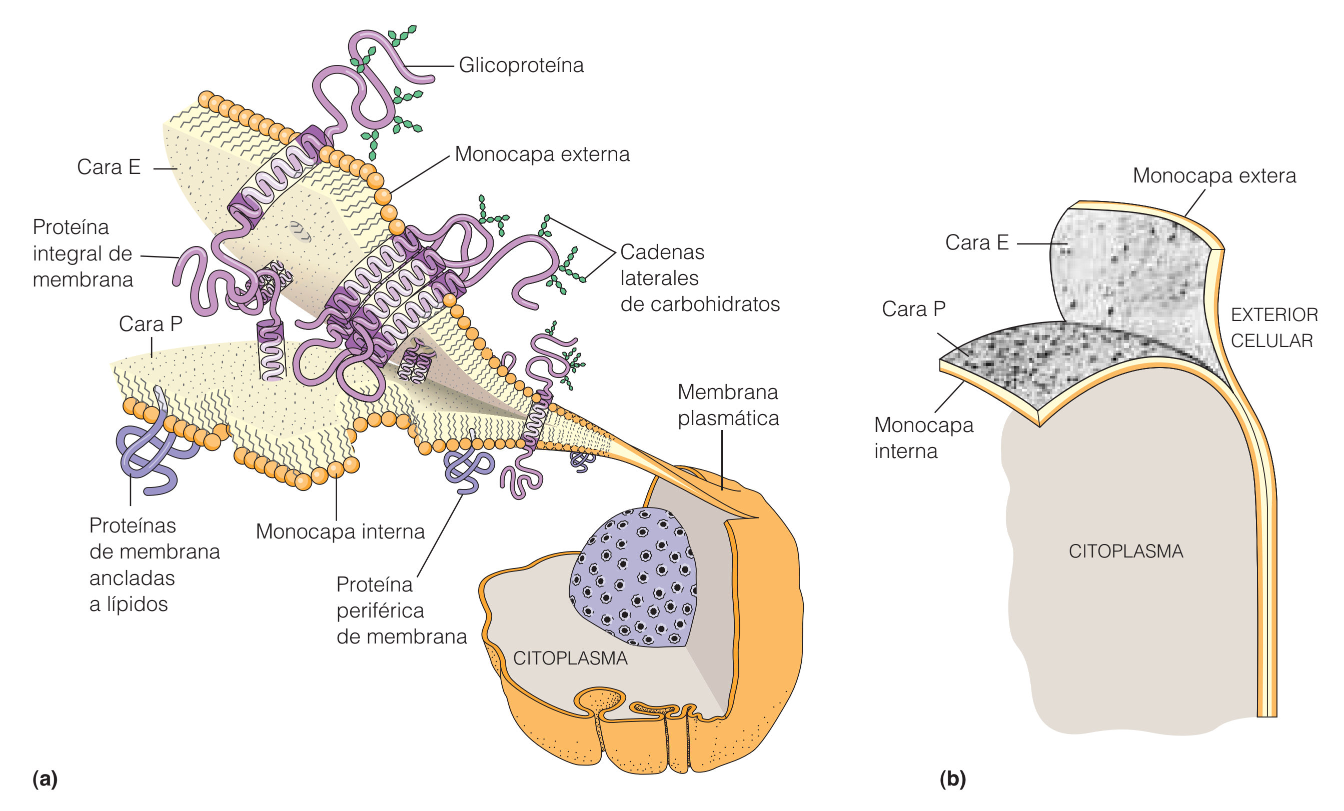


Figura 7.16 **Análisis de una membrana por criofractura.** (**a**) Dibujo de una membrana criofracturada en donde el plano de fractura pasa a través del interior hidrofóbico de la membrana, revelando las superficies internas de las dos monocapas. Los segmentos hidrofóbicos de las proteínas se muestran en púrpura claro, los segmentos hidrofílicos en púrpura oscuro. Las proteínas integrales de membrana que quedan en la monocapa externa se ven en la cara E (exoplásmica), mientras que los que quedan en la monocapa interna se ven en la cara P (protoplásmica). (**b**) Dibujo de una membrana criofracturada con micrografías electrónicas de las caras E y P de la membrana plasmática de una célula tubular renal de ratón sobrepuestas sobre el dibujo.

Las micrografías electrónicas de las membranas preparadas de esta forma proporcionan claras evidencias de que las proteínas están realmente suspendidas dentro de las membranas. Cuando el plano de fractura escinde la membrana en sus dos capas, se observan partículas con tamaño y forma de proteínas globulares en las dos superficies internas de las membranas, denominadas *caras E* (por *exoplásmica*) y *P* (por *protoplásmica*) (Figura 7.16b). Además, la abundancia de partículas se correlaciona con el contenido proteico de la membrana en estudio. Las micrografías electrónicas de la Figura 7.17 ilustran bien este punto. La membrana plasmática de los eritrocitos tiene un índice

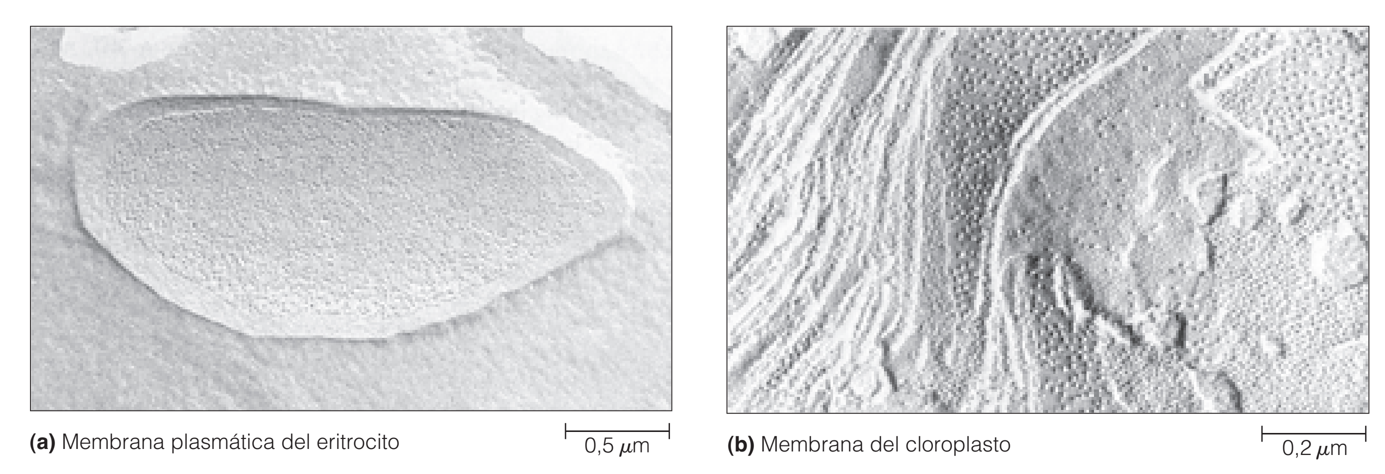


Figura 7.17a **Proteínas de membrana vistas con microscopía electrónica y criofractura.** Las proteínas de membrana aparecen como partículas discretas incluidas en la bicapa lipídica. La baja densidad de las partículas en la membrana del eritrocito (**a**) comparadas con la membrana del cloroplasto (**b**) se ajusta con el índice proteína/lípido de las dos membranas (1,14 y 2,33, respectivamente) (METs).

proteína/lípido bastante bajo (1,14; *véase* Tabla 7.1) y cuando se somete a criofractura presenta un índice de densidad de partículas bastante bajo (Figura 7.17a), mientras que la membrana del cloroplasto tiene un índice proteína/lípido más alto (2,33) y en comparación, una mayor densidad de partículas intramembranosas, especialmente en la capa lipídica interna (Figura 7.17b).

La confirmación de que las partículas observadas eran proteínas vino del trabajo de David Deamer y Daniel Branton, quienes utilizaron la técnica de la criofractura para examinar las bicapas artificiales con y sin proteínas añadidas. Las bicapas formadas a partir de fosfolípidos puros no mostraban evidencias de partículas en sus superficies internas (Figura 7.18a). Sin embargo, cuando se añadieron proteínas a las bicapas artificiales se vieron partículas similares a las observadas en las membranas naturales (Figura 7.18b).

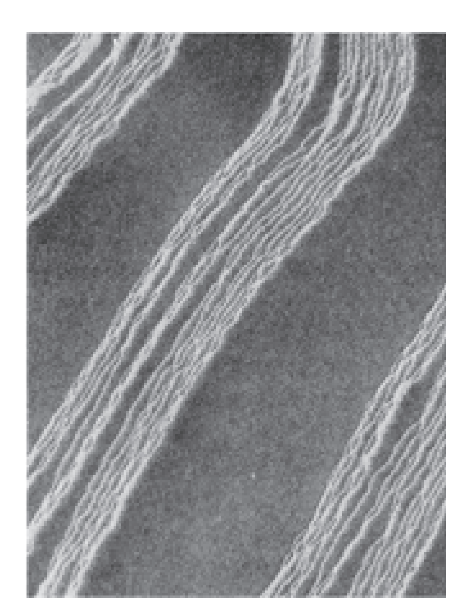
Las membranas contienen proteínas integrales, proteínas periféricas y proteínas ancladas a lípidos

Las proteínas de membrana difieren en su afinidad por el interior hidrofóbico de la membrana y por tanto en la manera en la que interactúan con la bicapa lipídica. Esto determina, en cambio, cómo de fácil o de difícil es extraer una proteína concreta de la membrana. Si nos basamos en las condiciones que se requieren para extraerlas y por extensión, en la naturaleza de su relación con la bicapa lipídica, las proteínas de membrana entrarían en una de estas tres categorías: integrales, periféricas o ancladas a lípidos. Consideraremos cada una de ellas por separado, refiriéndonos en cada caso a los esquemas que se muestran en la Figura 7.19.

La membrana plasmática del eritrocito humano, que se muestra en la Figura 7.20, proporciona el contexto celular para nuestra discusión. Ésta es una de las membranas más estudiadas desde los tiempos de Gorter y Grendel debido, principalmente a la facilidad con la que se dispone de células sanguíneas y lo sencillo que resulta obtener preparaciones de membrana plasmática pura, a partir de ellas. Nos referiremos a la membrana plasmática de los eritrocitos en varios puntos de la discusión para apuntar ejemplos de tipos de proteínas diferentes y su papel en la membrana.

Proteínas integrales de membrana. La mayoría de las proteínas de membrana son moléculas anfipáticas que poseen una o más regiones hidrofóbicas que exhiben afinidad por el interior también hidrofóbico de la bicapa lipídica. Estas proteínas se denominan **proteínas integrales de membrana** ya que sus regiones hidrofóbicas están incluidas en el interior de la membrana, de tal forma que estas moléculas no se pueden extraer con facilidad. Sin embargo, estas proteínas también presentan una o más regiones hidrofílicas que extienden hacia el exterior de la membrana, hacia la fase acuosa de uno o de los dos lados de la membrana. Debido a su afinidad por la bicapa lipídica, las proteínas integrales de membrana son difíciles de aislar y de estudiar por las técnicas estándar de purificación de proteínas, ya que la mayoría están diseñadas para proteínas solubles en agua. Para solubilizar y extraer las proteínas integrales de membrana suele ser necesario el tratamiento con un detergente que rompa la bicapa lipídica.

Sólo se conocen unas pocas proteínas integrales de membrana que estén incluidas en ella y que además sobresalgan por uno sólo de los lados de la bicapa; éstas se denominan **proteínas integrales monotópicas** (Figura 7.19a).



(a) Bicapas artificiales sin proteínas



(b) Bicapas artificiales con proteínas

Figura 7.18a Criofractura comparando bicapas lipídicas con y sin proteínas añadidas. Esta figura compara el aspecto de (**a**) bicapas lipídicas artificiales sin proteínas y (**b**) bicapas artificiales a las que se han añadido proteínas mediante microscopía electrónica con criofractura. Las líneas blancas de las membranas artificiales de la parte a representan bicapas lipídicas individuales en una muestra con múltiples capas, y las regiones grises muestran donde se han escindido las bicapas sencillas para revelar superficies lisas. Por el contrario, la membrana artificial de la parte b muestra un gran número de partículas globulares en la superficie de fractura. Éstas son las proteínas que se añadieron a la preparación de membrana (METs).

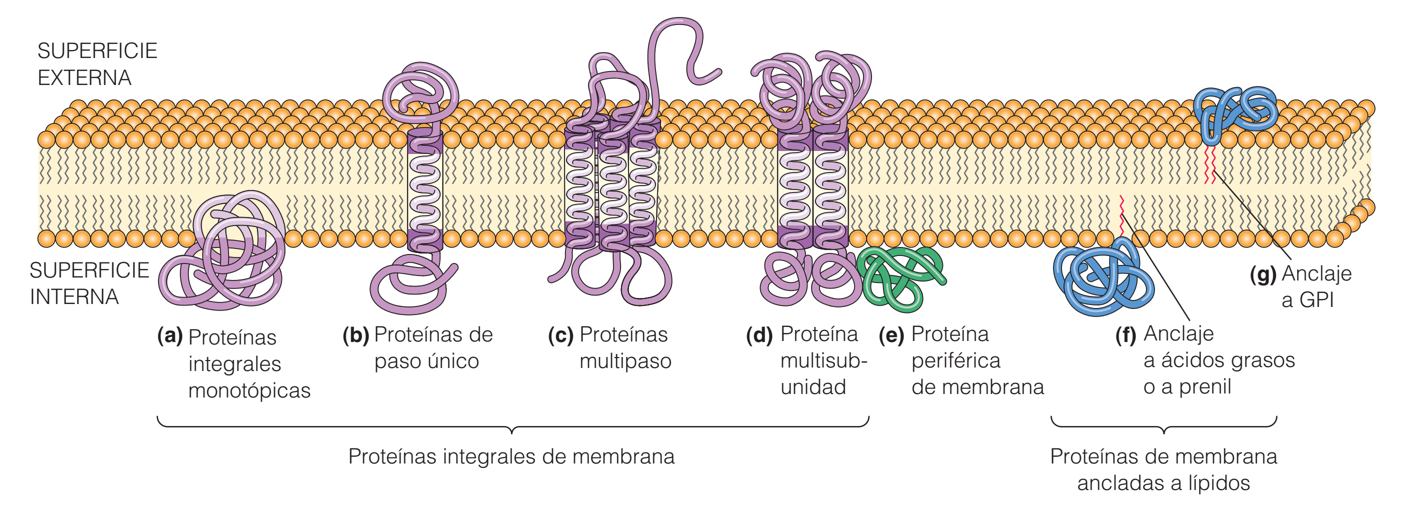


Figura 7.19 **Clases principales de proteínas de membrana.** Las proteínas de membrana se clasifican de acuerdo a su forma de anclaje a la membrana. Las proteínas integrales de la membrana (**a-d**) contienen una o más regiones hidrofóbicas incluidas dentro de la membrana lipídica. (**a**) Unas pocas proteínas integrales de membrana parecen estar incluidas en la membrana por un solo lado de la membrana (proteínas integrales monotópicas). Sin embargo, la mayoría de las proteínas integrales son proteínas transmembrana que cruzan la bicapa lipídica o (**b**) una vez (proteínas de paso único) o (**c**) muchas veces (proteínas de paso múltiple). Las proteínas de paso múltiple consisten en un único polipéptido, como en la parte c, o (**d**) varios polipéptidos asociados (proteínas multisubunidades). (**e**) Las proteínas periféricas de membrana son demasiado hidrofílicas como para penetrar en la membrana pero están ancladas a la membrana por uniones electrostáticas y puentes de hidrógeno que las fijan a proteínas de membrana adyacentes o a grupos de la cabeza de fosfolípidos. Las proteínas ancladas a lípidos (**f-g**) son hidrofílicas y no penetran en la membrana, están ligadas covalentemente a moléculas lipídicas que están incluidas en la bicapa lipídica. (**f**) Normalmente las proteínas de la superficie interna de la membrana están ancladas o bien a ácidos grasos o bien a grupos prenil. (**g**) En la superficie externa de la membrana, el lípido de anclaje más habitual es el glicosilfosfatidilinositol (GPI).

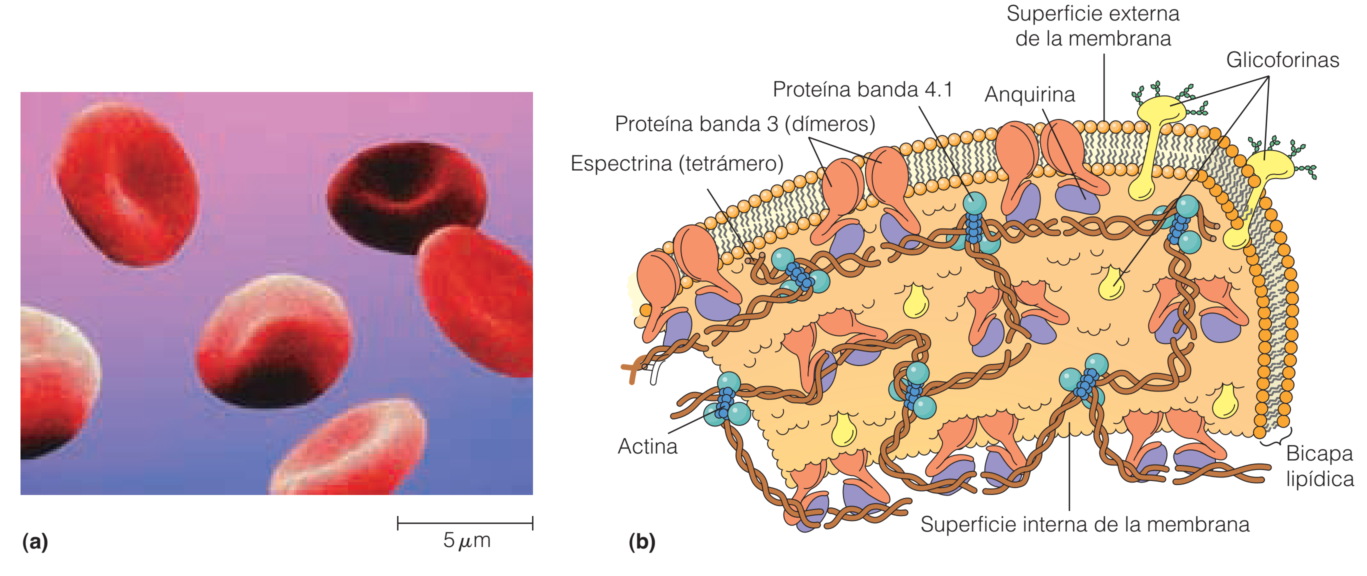


Figura 7.20 **Características estructurales de la membrana plasmática del eritrocito.** (**a**) Un eritrocito es una célula pequeña con forma de disco con un diámetro de alrededor de 7 μm. Un eritrocito de mamífero no tiene núcleo ni otros orgánulos, hecho que permite obtener con facilidad preparaciones de membrana plasmática muy puras sin contaminación por membranas de orgánulos, como sucede a menudo con las preparaciones de membrana plasmática de otros tipos celulares. (**b**) La membrana plasmática del eritrocito vista desde el interior de la célula. La membrana tiene una composición proteica relativamente simple. Las dos proteínas integrales más importantes de la membrana son la glicoforina y una proteína intercambiadora de aniones conocida por su movilidad electroforética como banda 3. La membrana está anclada al citoesqueleto subyacente por filamentos largos y finos de espectrina tetramérica $(\alpha\beta)_2$, que a su vez, están ligadas a las moléculas de glicoforina por la proteína banda 4,1 y a la proteína banda 3 por anquirina, otra proteína periférica de membrana. Los extremos libres de los tetrámeros adyacentes de espectrina se mantienen unidos por cadenas cortas de actina y de banda 4,1. No se muestra otra proteína, banda 4,2, que ayuda a la anquirina a anclar a la espectrina a la proteína banda 3. Para ver el fraccionamiento electroforético de estas proteínas, *véase* Figura 7.22.

Sin embargo, la mayoría de las proteínas integrales de membrana son **proteínas transmembrana**, lo que significa que cruzan la membrana y que tienen regiones hidrofílicas que sobresalen de la membrana por los dos lados. Tales proteínas atraviesan la membrana una vez (*proteínas de paso único*; Figura 7.19b) o varias veces (*proteínas de paso múltiple*; Figura 7.19c). Algunas proteínas de paso múltiple consisten en un único polipéptido (Figura 7.19c), mientras que otras tienen dos o más polipéptidos (*proteínas multisubunidades*; Figura 7.19d).

La mayoría de las proteínas transmembrana están ancladas a la bicapa lipídica por uno o más **segmentos transmembrana** hidrofóbicos, uno por cada vez que la proteína atraviesa la bicapa. En la mayoría de los casos, la cadena polipeptídica parece que cruza la membrana con una conformación en hélice α formada por unos 20-30 residuos de aminoácidos, la mayoría de los cuales —a veces, incluso todos— tienen grupos R hidrofóbicos. Sin embargo, en algunas proteínas de paso múltiple varios segmentos transmembrana se colocan como lámina β, del tipo lámina β cerrada —la denominada *barril β*—. Esta estructura es especialmente relevante en un grupo de proteínas transmembrana formadoras de poros denominadas *porinas*, que se encuentran en la membrana externa de muchas bacterias, cloroplastos y también mitocondrias. Independientemente de su conformación, normalmente los segmentos transmembrana están separados en la estructura primaria de la proteína por secuencias hidrofílicas que sobresalen o forman bucles hacia el exterior de los dos lados de la membrana.

Las proteínas de membrana de paso único tienen un único segmento transmembrana, con un extremo carboxilo (C-) hidrofílico extendiéndose hacia el exterior de la membrana en un lado y un extremo amino (N-) hidrofílico sobresaliendo por el otro lado. Dependiendo de cada proteína en particular, el extremo C- puede sobresalir en cualquier lado de la membrana. Un ejemplo de una proteína de paso único es la *glicoforina*, una proteína importante de la membrana plasmática del eritrocito (Figura 7.20b). La glicoforina se orienta en la membrana de tal manera que su extremo C- está en la superficie interna de la membrana y su extremo N- está en la superficie externa (Figura 7.21a).

Las proteínas de membrana de paso múltiple tienen varios segmentos transmembrana, en un rango de 2 ó 3 a 20 o más segmentos. Un ejemplo de una proteína de paso múltiple en la membrana plasmática del eritrocito es una proteína de transporte dimérica denominada *proteína banda 3* (también conocida como la *proteína de intercambio de aniones*). Cada uno de estos dos polipéptidos atraviesa la bicapa lipídica por lo menos seis veces, con ambos extremos el C- terminal y el N- terminal en el mismo lado de la membrana. Los modelos actuales de esta proteína dimérica aceptan la existencia de un total de doce segmentos transmembrana.

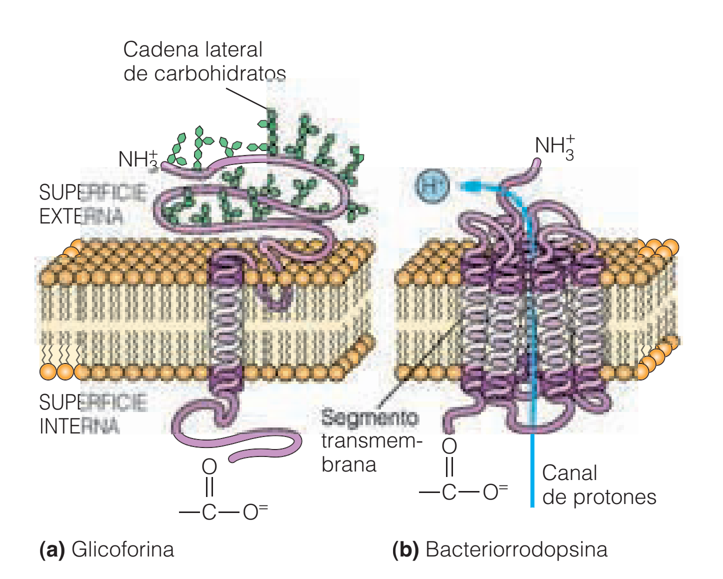


Figura 7.21 **Estructura de dos proteínas integrales de membrana.** (**a**) La glicoforina es una proteína integral de la membrana de paso único. Su segmento transmembrana en α-hélice consta enteramente de aminoácidos hidrofóbicos. El extremo N-terminal sobresale por la superficie externa, el extremo C-terminal por la superficie citoplasmática. La glicoforina es una glicoproteína, con 16 cadenas de carbohidrato unidas a su superficie externa. (**b**) La bacteriorrodopsina es una proteína integral de membrana de paso múltiple situada en la membrana plasmática de *Halobacterium*. Sus siete segmentos transmembrana, que cuentan con el 70% de sus 248 aminoácidos, se organizan en un canal de protones. Los extremos C-terminal y N-terminal de la proteína tienen segmentos hidrofílicos cortos, que sobresalen por las superficies interna y externa de la membrana plasmática, respectivamente. Los segmentos hidrofílicos cortos se ligan a cada uno de los segmentos transmembrana.

Uno de los ejemplos mejor estudiados de una proteína de paso múltiple es la bacteriorrodopsina, la proteína de la membrana plasmática que funciona en las halobacterias como una bomba de protones (Figura 7.3g).

En 1975 Unwin y Henderson presentaron su estructura tridimensional, basándose en la microscopía electrónica. Resultó que la bacteriorrodopsina tenía siete segmentos en hélice α que atravesaban la membrana, cada uno de ellos correspondía a una secuencia de aproximadamente 20 aminoácidos hidrofóbicos de la estructura primaria de la proteína (Figura 7.21b). Los siete segmentos transmembrana se colocan en la membrana para formar un canal, activado por luz, que facilite el bombeo o el transporte activo de los protones a través de la membrana, un tema sobre el que volveremos en el Capítulo 8.

Proteínas periféricas de membrana. En comparación con las proteínas integrales de membrana, algunas proteínas asociadas a la membrana carecen de secuencias hidrofóbicas diferenciadas y por tanto no penetran en la bicapa lipídica. En vez de esto, estas **proteínas periféricas de membrana** se unen, mediante fuerzas electrostáticas débiles y puentes de

hidrógeno, a la superficie de la membrana a través de las porciones hidrofílicas de las proteínas integrales y quizás a través de los grupos polares de las cabezas de los lípidos de la membrana (Figura 7.19e). Las proteínas periféricas se extraen más fácilmente de la membrana que las proteínas integrales y normalmente se extraen cambiando el pH o la fuerza iónica.

Las principales proteínas periféricas de la membrana plasmática del eritrocito son la *espectrina*, la *ankirina* y una proteína denominada *banda 4.1* (*véase* Figura 7.20b). Estas proteínas se unen a la superficie interna de la membrana plasmática, donde forman un entramado esquelético que sirve de soporte a la membrana plasmática y ayuda a mantener la forma del eritrocito (*véase* Figura 7.20a).

Proteínas de membrana ancladas a lípidos. Inicialmente cuando Singer y Nicolson propusieron su modelo de mosaico fluido, todas las proteínas se catalogaban como proteínas periféricas o como proteínas integrales de membrana. Ahora, sin embargo, se reconoce una tercera clase de proteínas que no es ni específicamente periférica ni integral, pero que tiene algunas de las características de las dos. Las cadenas polipeptídicas de estas **proteínas de membrana ancladas a lípidos** se localizan en una de las superficies de la bicapa lipídica pero están unidas covalentemente a moléculas lipídicas incluidas dentro de la bicapa (Figura 7.19f y g).

Las proteínas ancladas a los lípidos se fijan a las membranas mediante varios mecanismos. Las proteínas unidas a la superficie interna de la membrana plasmática se anclan por medio de la formación de enlaces covalentes con un ácido graso o con un derivado isopreno denominado grupo *prenil* (Figura 7.19f). En el caso de las **proteínas de membrana ancladas a ácidos grasos**, la proteína se sintetiza en el citosol y después se une covalentemente a un ácido graso saturado incluido dentro de la bicapa de la membrana, que normalmente es el *ácido mirístico* (14 carbonos) o el *ácido palmítico* (16 carbonos). Por otro lado, las **proteínas de membrana preniladas** se sintetizan en el citosol como proteínas solubles después se modifican añadiéndoles un grupo prenil, normalmente un grupo *farnesil* de 15 carbonos o un grupo *geranilgeranil* de 20 carbonos. Después de la unión, tanto el grupo farnesil como el grupo geranilgeranil se insertan en la bicapa lipídica de la membrana.

Muchas proteínas ancladas a lípidos y que se fijan a la superficie externa de la membrana plasmática se unen covalentemente a *glicosilfosfatidilinositol* (GPI), un glicolípido unido a la monocapa externa de la membrana plasmática (Figura 7.19g). Estas **proteínas de membrana ancladas a GPI** se sintetizan en el retículo endoplasmático como proteínas transmembrana de paso único, que posteriormente eliminarán sus segmentos transmembrana y los sustituirían por anclajes a GPI. Posteriormente las proteínas se transportan desde el RE hasta el exterior de la membrana plasmática por una vía que comentaremos en el Capítulo 12. Una vez que llegan a la superficie celular, las proteínas ancladas a GPI se liberan de la membrana por la enzima *fosfolipasa C*, que es específica para los enlaces fosfatidilinositol.

Las proteínas se pueden separar por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

Antes de continuar con nuestra discusión sobre las proteínas de membrana, nos será útil considerar brevemente cómo se aíslan y se estudian las proteínas de membrana. Primero veremos el problema general de la solubilización y extracción de proteínas de membrana y después aprenderemos una técnica electroforética de gran utilidad en el fraccionamiento y caracterización de proteínas.

Aislamiento de proteínas de membrana. El mayor desafío de los químicos de proteínas ha sido la dificultad para aislar y estudiar las proteínas de membrana, ya que muchas de éstas son hidrofóbicas. Las proteínas periféricas de membrana son, en general, bastante sensibles a las técnicas empleadas para su aislamiento. Como se apuntó previamente, están unidas a la membrana por interacciones electrostáticas débiles y puentes de hidrógeno, por las porciones hidrofílicas de las proteínas integrales de membrana o por los grupos polares de las cabezas de los lípidos de la membrana. Además, las proteínas periféricas se pueden extraer de la membrana mediante cambios en el pH o en la fuerza iónica. De hecho a las proteínas periféricas de membrana, inicialmente se las definió como aquellas proteínas que podían ser extraídas de la membrana con una solución alcalina de carbonatos a un determinado pH y con una determinada fuerza iónica. Las proteínas periféricas también se pueden solubilizar mediante el uso de agentes quelantes (que se unen a cationes) que extraen el calcio o añadiendo urea, que rompe los puentes de hidrógeno. Las proteínas ancladas a lípidos son igualmente susceptibles al aislamiento, aunque se requiere la ruptura previa de la unión covalente al lípido. Una vez extraídas de la membrana, la mayoría de las proteínas periféricas de membrana y las proteínas ancladas a los lípidos son lo suficientemente hidrofílicas como para ser purificadas y estudiadas con las técnicas utilizadas habitualmente por los químicos de proteínas.

Por otro lado, las proteínas integrales de membrana, son difíciles de aislar de ésta, especialmente de forma que se preserve su actividad biológica. En la mayoría de los casos se pueden solubilizar solamente mediante el uso de detergentes que desorganizan las interacciones hidrofóbicas y disuelven la bicapa lipídica. Como veremos ahora, el uso de detergentes fuertemente iónicos como el dodecil sulfato sódico (SDS) permite no sólo aislar las proteínas integrales de membrana sino fraccionarlas y analizarlas mediante la técnica de la electroforesis.

Electroforesis con gel de poliacrilamida y SDS. Las células contienen miles de macromoléculas diferentes que deben ser separadas unas de otras antes de investigar las propiedades de cada componente de manera individual. Uno de los enfoques utilizados habitualmente para separar moléculas es la **electroforesis**, conjunto de técnicas relacionadas que utilizan un campo eléctrico para separar moléculas cargadas eléctricamente. La velocidad a la cual una molécula dada se mueve durante la electroforesis depende tanto de su carga como de su tamaño. La electroforesis puede llevarse a cabo utilizando una gran variedad de medios de soporte, tales como el papel, acetato de celulosa, almidón, poliacrilamida o agarosa (un polisacárido obtenido de las algas marinas). De todos estos medios, los geles realizados con poliacrilamida o con agarosa son los que proporcionan la mejor resolución y son los que se emplean habitualmente en las electroforesis de ácidos nucleicos y proteínas.

Cuando se utiliza la electroforesis para estudiar proteínas de membrana, primero hay que solubilizar los fragmentos de membrana con el detergente SDS que desorganiza la mayoría de las uniones proteína-proteína y proteína-lípido. Las proteínas se desnaturalizan, desplegándose como varillas polipeptídicas rígidas que no se pueden replegar debido a que sus superficies están cubiertas con moléculas de detergente cargadas negativamente. Los polipéptidos solubilizados y cubiertos con SDS, se cargan entonces en la zona superior del gel de poliacrilamida, se aplica un potencial eléctrico que atraviesa el gel, de tal forma que la base del gel se convertirá en el ánodo cargado positivamente (Figura 7.22). Debido a que los po-

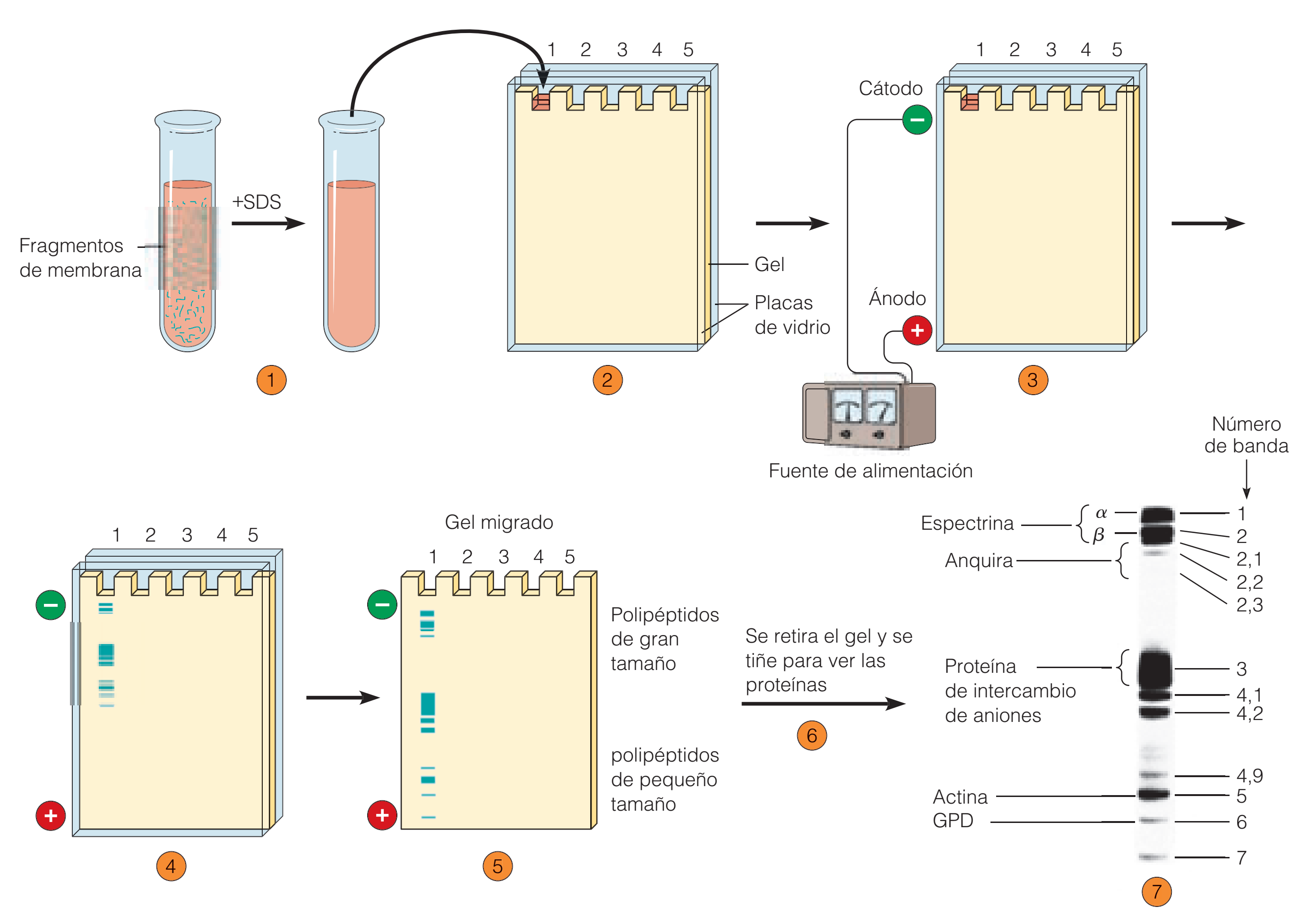


Figura 7.22 Electroforesis de proteínas de membrana en gel de poliacrilamida con SDS. Los fragmentos de membrana se suspenden en un tampón y ① se tratan con dodecilsulfatosódico (SDS). ② Una pequeña muestra de los polipéptidos solubilizados se aplica en uno de los pocillos de la parte superior de un gel de poliacrilamida que se ha polimerizado entre dos placas de vidrio (sólo se utiliza en el ejemplo uno de los cinco pocillos numerados, pero en la práctica se colocarían muestras en los otros pocillos también). ③ Se aplica un potencial eléctrico al gel ④ que provoca la migración de las moléculas polipeptídicas hacia el extremo más alejado del gel. ⑤ Cada polipéptido desciende en el gel a una velocidad que está inversamente relacionada con su tamaño. ⑥ Cuando los polipéptidos más pequeños están cerca de la base, el gel se retira de las placas y se tiñe con un colorante que se une a los polipéptidos y los hace visibles. (Las bandas coloreadas que se muestran en los pasos 4 y 5 no son visibles hasta que el gel se separa de las placas y se tiñe). ⑦ El perfil polipeptídico que se muestra aquí, es el de las principales proteínas de la membrana del eritrocito. Las bandas de proteína separadas inicialmente se identificaron utilizando números secuenciales, por ejemplo «banda 1», «banda 2» etc. Ahora sabemos la identidad de algunas de estas proteínas separadas; por ejemplo la banda 3 es una proteína de intercambio de aniones y la banda 6 es la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GPD).

lipéptidos están cubiertos con moléculas de SDS cargadas negativamente, migrarán, descendiendo por el gel, hacia el ánodo. Se puede pensar en el gel de poliacrilamida como en una red fina que dificulta más el movimiento de las moléculas grandes que el de las moléculas pequeñas. El resultado es que los polipéptidos descienden por el gel a una velocidad que está relacionada inversamente con su tamaño.

Cuando los polipéptidos más pequeños se acercan a la base del gel, el proceso termina y el gel se tiñe con un colorante que se une a los polipéptidos y les hace visibles. (El colorante que se utiliza habitualmente con este propósito, es el *azul brillante de Coomassie.*) El perfil polipeptídico particular que se muestra en la Figura 7.22 es el de las proteínas de membrana de los eritrocitos humanos, a la mayoría de las cuales ya nos hemos referido (recordar Figura 7.20b).

Resulta cada vez más viable determinar la estructura tridimensional de las proteínas de membrana

Determinar la estructura tridimensional de las proteínas integrales de la membrana ha estado lleno de dificultades durante muchos años. Primero, porque estas proteínas eran difíciles de aislar y de purificar. Sin embargo, resultaron cada vez más susceptibles al estudio por *cristalografía de rayos X*, que determina la estructura de las proteínas que se pueden aislar en forma cristalina.

Para las proteínas que no pueden estudiar por cristalografía se utiliza un abordaje alternativo denominado análisis hidropático siempre que la proteína se pueda, al menos, aislar y secuenciar. Examinaremos brevemente cada una de estas técnicas.

Cristalografía de rayos X. La **cristalografía de rayos X** se utiliza generalmente para determinar la estructura tridimensional de las proteínas. Se incluye una descripción de esta técnica en el Apéndice (*véase* pp. A1-A30). Durante muchos años, la dificultad para aislar proteínas integrales de membrana en forma cristalina, prácticamente excluyó a estas proteínas del análisis cristalográfico. El primer éxito fue presentado por Hartmut Michel, Johann Deisenhofer y Robert Huber, quienes cristalizaron el centro de reacción fotosintético de la bacteria púrpura, *Rhodopseudomonas viridis*, y determinaron su estructura molecular por cristalografía de rayos X. Estos investigadores, basándose en la estructura tridimensional detallada de la proteína, también proporcionaron las primeras pistas de cómo se ordenan las moléculas de pigmentos para captar la energía luminosa, un tema sobre el que volveremos en el Capítulo 11 (*véase* Figura 11.11). En reconocimiento a este trabajo Michel, Deisenhofer y Huber compartieron el Premio Nobel de Química en 1988.

A pesar de este gran avance, la aplicación de la cristalografía de rayos X para las proteínas integrales de membrana progresó lentamente hasta finales de los 90, particularmente en lo que respecta al nivel de resolución que se requiere para identificar hélices transmembrana. Sin embargo, desde entonces, ha habido una verdadera explosión de datos de cristalografía de rayos X para proteínas integrales de membrana. De acuerdo con los datos reunidos por Stephen White y colaboradores en la Universidad de California, Irvine, en 1997 solamente se habían determinado las estructuras tridimensionales de 18 proteínas, pero desde entonces, se han añadido a la lista más de 60 proteínas. Inicialmente, la mayoría de las proteínas eran de origen bacteriano, reflejando así la relativa facilidad con la que se aislaban las proteínas de membrana de los microorganismos. Sin embargo, cada vez más proteínas de membrana de origen eucariota están siendo analizadas por cristalografía de rayos X.

Análisis hidropático. Para la mayoría de las proteínas integrales de membrana que todavía no se han analizado por cristalografía de rayos X, se puede inferir el número y localización más probable de sus segmentos transmembrana, siempre que, la proteína pueda por lo menos, aislarse y secuenciarse. Una vez que se conoce la secuencia de aminoácidos de una proteína, se puede inferir el número y posición de los segmentos transmembrana a partir de una **representación de hidropatía** (o **hidrofobicidad**), como se muestra en la Figura 7.23. Tal representación se construye utilizando un programa de ordenador que identifica grupos de aminoácidos hidrofóbicos. La secuencia de aminoácidos de la proteína se escanea a través de una serie de «ventanas» de aproximadamente 10 aminoácidos cada vez; a medida que se suceden las ventanas, se va avanzando un aminoácido más en la secuencia.

Basándose en los valores de hidrofobicidad conocidos para los diferentes aminoácidos, se calcula un **índice de hidropatía** para cada ventana consecutiva, calculando la media de los valores de hidrofobicidad de los aminoácidos de la ventana. Por convención, los aminoácidos hidrofóbicos tienen valores de hidropatía positivos y los residuos hidrofílicos tienen valores negativos (como se describe en la leyenda de la Figura 7.23). El índice de hidropatía se representa frente a las posiciones de las ventanas en la secuencia de la proteína. La representación hidropática resultante, predice, basándose en el número de picos positivos, cuántas de las regiones presentes en la proteína cruzarán la membrana. La representación hidropática que se muestra en la Figura 7.23a es de una proteína de la membrana plasmática denominada *conexina.* La representación muestra cuatro picos positivos y además predice que la conexina tiene cuatro tramos de aminoácidos hidrofóbicos y por lo tanto cuatro segmentos transmembrana, como se muestra en la Figura 7.23b.

La biología molecular ha contribuido enormemente a nuestro conocimiento sobre las proteínas de membrana

Las proteínas de membrana no han cedido ante las técnicas bioquímicas tan fácilmente como otras proteínas, debido principalmente a los problemas para aislar y purificar las proteínas hidrofóbicas activas fisiológicamente. Procedi-

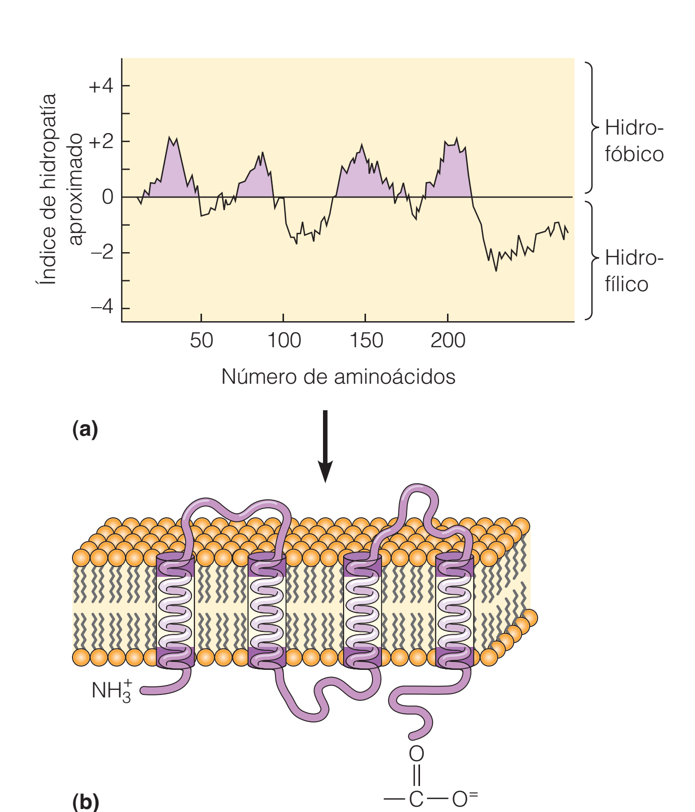


Figura 7.23 Análisis de hidropatía de proteínas integrales de membrana. Una representación de hidropatía es una forma de representar las regiones hidrofóbicas (valores positivos) y las regiones hidrofílicas (valores negativos) a lo largo de la longitud de la secuencia de una proteína —la proteína de membrana plasmática *conexina*, en este caso—. (**a**) El índice de hidropatía sobre el eje vertical es una medida numérica de la hidrofobicidad relativa de segmentos sucesivos de la cadena del polipéptido, basada en su secuencia de aminoácidos. (**b**) La conexina tiene cuatro regiones hidrofóbicas distintas, que corresponden a cuatro segmentos en a-hélice que cruzan la membrana plasmática. (El valor de hidrofobicidad para un aminoácido dado es la variación de la energía libre estándar, $\Delta G^{o\prime}$, por la transferencia de un mol de ese aminoácido desde un medio hidrofóbico hacia un medio acuoso, expresado en kilojulios/mol. Para un aminoácido hidrofílico, el proceso es exergónico y por tanto tiene un $\Delta G^{o\prime}$, negativo; para un aminoácido hidrofóbico, el proceso es endergónico y el valor de $\Delta G^{o\prime}$, es positivo. (Para más detalles, *véase* Problema 7.10).

mientos como la electroforesis con geles de poliacrilamida y SDS y los análisis de hidropatía han sido útiles, como también lo han sido las técnicas de marcaje con isótopos radiactivos y anticuerpos fluorescentes de las que hablaremos más adelante en este capítulo. Sin embargo, en las tres últimas décadas el estudio de las proteínas de membrana ha sufrido una revolución debido a las técnicas de biología molecular, especialmente por la secuenciación de DNA y por las tecnologías de DNA recombinante. La secuenciación de DNA permite deducir la secuencia de aminoácidos de una proteína, un prerrequisito para el análisis hidropático que identificará los segmentos transmembrana. Además, la comparación de secuencias entre proteínas revela, con frecuencia, relaciones evolutivas y funcionales que de otra forma no se habrían apreciado. También se pueden utilizar fragmentos de DNA como sondas para aislar e identificar secuencias que codifican proteínas relacionadas. Además, se pueden alterar nucleótidos específicos de la secuencia de DNA de una proteína concreta, para determinar los efectos de esos cambios selectivos de la secuencia, sobre la actividad de la proteína mutante para la que codifica. El Anexo 7A describe estos excitantes descubrimientos en más detalle.

Las proteínas de membrana tienen varias funciones

¿Qué funciones realizan las proteínas de membrana? La mayoría de las funciones de la membrana que hemos resumido al inicio del capítulo son relevantes en este punto debido a que éstas son justamente las de sus componentes químicos, especialmente las de sus proteínas.

Algunas de las proteínas de la membrana son *enzimas*, localizando funciones específicas en membranas concretas. De hecho, como veremos en los siguientes capítulos, cada uno de los orgánulos de una célula eucariota, se caracteriza por su propio y distintivo conjunto de enzimas unidas a membrana. Encontrará un ejemplo de este hecho cuando comentemos la asociación de la glucosa fosfatasa con el RE. Otro ejemplo, es el de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GPD), una enzima implicada en el catabolismo de la glucosa plasmática. La GPD es una proteína periférica de la membrana plasmática de los eritrocitos y de otros tipos celulares (*véase* Figura 7.22, paso 7). Las *proteínas transportadoras de electrones* como los citocromos y las proteínas ferrosulfuradas, implicadas en los procesos oxidativos en las membranas de las mitocondrias, de cloroplastos y en membranas plasmáticas de células eucariotas, están por su función, estrechamente relacionadas con las enzimas.

Otras proteínas de membrana funcionan transportando solutos a través de ellas. Entre éstas se incluyen las *proteínas transportadoras*, que facilitan el movimiento de nutrientes como azúcares y aminoácidos a través de las membranas, y *proteínas canal* que proporcionan vías de paso hidrofílicas a través de membranas hidrofóbicas. En esta categoría también se encuentran las *ATPasas transportadoras*, que utilizan la energía del ATP para bombear iones a través de las membranas, como veremos en más detalle en el Capítulo 8.

Otras proteínas de membrana son *receptores* implicados en el reconocimiento y mediación de los efectos de señales químicas específicas que se unen a la superficie de la célula. Las hormonas, neurotransmisores y sustancias que promueven el crecimiento son ejemplos de señales químicas que interactúan con receptores proteicos específicos situados en la membrana plasmática de sus células diana. En la mayoría de los casos, la unión de una hormona o de otra molécula señal al receptor apropiado de la superficie de la membrana desencadena un tipo de respuesta intracelular,

para obtener el efecto deseado; consideraremos estos mecanismos de transducción de la señal en el Capítulo 14.

Las proteínas de membrana también están implicadas en la comunicación intercelular. Los ejemplos incluyen a las proteínas que forman los *conexones* de las *uniones gap* entre células animales, y aquellas que ensamblan los *desmotúbulos* de los *plasmodesmos* entre células vegetales. Estas estructuras se tratarán en el Capítulo 17, como proteínas de membrana que median el reconocimiento y adhesión intercelular.

Las proteínas de membrana desempeñan un papel principal, en la captación y secreción de sustancias por endocitosis y exocitosis; en el marcaje, clasificación y modificación de proteínas en el retículo endoplásmico y en el complejo de Golgi; y en la captación de la luz, bien por el ojo humano o por la planta de la semilla según emerge del suelo. En resumen, las proteínas de membrana son componentes vitales de varias estructuras, incluyendo las conexiones entre la membrana plasmática y la matriz extracelular situada en el exterior de la célula, los poros de membranas externas tanto de mitocondrias como de cloroplastos, y los poros de la envoltura nuclear. Todos estos temas se verán en capítulos posteriores.

Un grupo final de proteínas asociadas a la membrana son aquéllas con papel estructural, que estabilizan y dan forma a la membrana celular. Los ejemplos incluyen a las proteínas espectrina, anquirina y banda 4.1, proteínas periféricas de la membrana del eritrocito de las que ya hemos hablado anteriormente (*véase* Figura 7.20b). Existen tetrámeros de espectrina α y β, $(\alpha\beta)_2$ largos y finos, unidos a moléculas de glicoforina por la proteína banda 4.1 y por filamentos cortos de actina y a proteínas banda 3 a través de anquirina y por otra proteína denominada banda 4.2. (De manera bastante apropiada *anquirina* deriva de la palabra griega para «anclar».) De esta forma, la espectrina y sus proteínas asociadas forman una red de citoesqueleto que subyace a la membrana plasmática y la sujeta. Esta red basada en la espectrina le da al glóbulo rojo de la sangre su forma bicóncava característica (*véase* Figura 7.20a) y le permite a la célula resistir el estrés que se ejerce sobre su membrana al atravesar los capilares estrechos del sistema circulatorio. Las proteínas que son homólogas estructuralmente a la espectrina y las proteínas asociadas a espectrina se encuentran justo por debajo de la membrana plasmática también en otros muchos tipos celulares, indicando que una red de citoesqueleto de proteínas periféricas de membrana subyace a la membrana plasmática de muchas clases de células diferentes.

La función de una proteína de membrana normalmente se refleja en el modo en el que la proteína se asocia a la bicapa lipídica. Por ejemplo, una proteína que funciona solamente en un lado de la membrana es probablemente una proteína periférica o una proteína anclada a lípidos. Las enzimas unidas a membrana que catalizan reacciones sólo en un lado de una membrana, tal como hace la enzima glucosa fosfatasa del RE, están en esta categoría. Por el contrario, las tareas de transportar solutos o de transmitir señales a través de la membrana requieren claramente proteínas transmembrana. En el Capítulo 8, examinaremos el papel de las proteínas transmembrana en el transporte de membrana, y en el Capítulo 14, veremos cómo la transducción de señales está mediada por receptores transmembrana que en el exterior de la membrana plasmática se unen a moléculas señalizadotas, como las hormonas que generan señales en el interior de celular.

Las proteínas de membrana están orientadas asimétricamente a través de la bicapa lipídica

Previamente en este capítulo, hemos apuntado que la mayoría de los lípidos de membrana se distribuyen asimétricamente entre las dos monocapas de la bicapa lipídica. La mayoría de las proteínas de membrana exhiben también una orientación asimétrica con respecto a la bicapa. Por ejemplo, las proteínas periféricas, las proteínas ancladas a lípidos, y las proteínas integrales monotípicas están, por definición, asociadas con una u otra de las superficies de la membrana (*véase* Figura 7.19); una vez en su sitio, las proteínas no se pueden mover a través de la membrana de una superficie a la otra. Las proteínas integrales de membrana que cruzan la membrana están incluidas en ambas monocapas, pero orientadas asimétricamente —es decir, las regiones de la molécula proteica que están expuestas en un lado de la membrana son estructural y químicamente diferentes de las regiones de la proteína expuestas al otro lado de la membrana—. Además, todas las moléculas de una proteína dada están orientadas siempre de la misma forma en la membrana.

Para determinar cómo se orientan las proteínas en la membrana, se han ideado experimentos que mediante marcaje radiactivo permiten distinguir entre proteínas expuestas en la superficie interna y externa de vesículas de membrana. Un enfoque de este tipo utiliza la enzima *lactoperoxidasa* (LP), que cataliza la unión covalente del yodo a proteínas. Cuando la reacción se realiza en presencia de ^{125}I, un isótopo radiactivo del yodo, la LP marca las proteínas. Debido a que la LP es demasiado grande para pasar a través de las membranas, sólo las proteínas expuestas en la superficie externa de las vesículas de membrana intactas se marcan (Figura 7.24a). Para marcar sólo aquellas proteínas que están expuestas en la superficie de la membrana interna, las vesículas primero se exponen a una solución hipotónica (de baja fuerza iónica) que las haga más permeables a moléculas grandes. En estas condiciones, la LP puede entrar en las vesículas. Cuando las vesículas se transfieren posteriormente a una solución isotónica que contiene ^{125}I pero no LP externa, la enzima marca las proteínas expuestas sobre la superficie interna de la membrana de la vesícula (Figura 7.24b y c). De esta forma, es posible determinar si una proteína de membrana concreta está expuesta sólo

Revolucionando el estudio de las proteínas de membrana: el impacto de la biología molecular

Las proteínas de membrana median una extraordinaria variedad de funciones celulares y además son de gran interés para los biólogos celulares. Sin embargo, sólo en los últimos años, el estudio de estas proteínas ha empezado a dar respuestas y resultados definitivos. Algunas de estas respuestas proceden de la aplicación de las técnicas bioquímicas a las proteínas de membrana. Algunas de estas aplicaciones se describen en este capítulo, incluyendo la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, el análisis hidropático y los métodos para marcar proteínas de membrana con radiactividad o con anticuerpos fluorescentes (*véase* Figuras 7.22, 7.23, 7.24 y 7.28 respectivamente). Para estudiar proteínas de membrana, se utilizan otros dos abordajes bioquímicos, que son, el marcaje de afinidad y la reconstitución de membranas.

El *marcaje de afinidad* utiliza moléculas radiactivas que se unen a proteínas de membrana específicas debido a las funciones de esas proteínas. Por ejemplo, de un compuesto denominado citocalasina B, se sabe que es un potente inhibidor del transporte de glucosa. Además, es probable que las membranas expuestas a citocalasina B radiactiva contengan radiactividad unida específicamente a la(s) proteína(s) implicadas en el transporte de glucosa.

La *reconstitución de membranas* implica la formación de membranas artificiales a partir de componentes específicos purificados. En este experimento las proteínas se extraen de las membranas con soluciones detergentes y se separan en sus componentes proteicos individuales. En condiciones conocidas las proteínas purificadas se mezclan, con fosfolípidos, para promover la formación de vesículas de membrana, denominadas *liposomas.* Estas vesículas reconstituidas se pueden evaluar para comprobar su capacidad para realizar funciones, que, se sabe o se supone, están mediadas por proteínas de membrana.

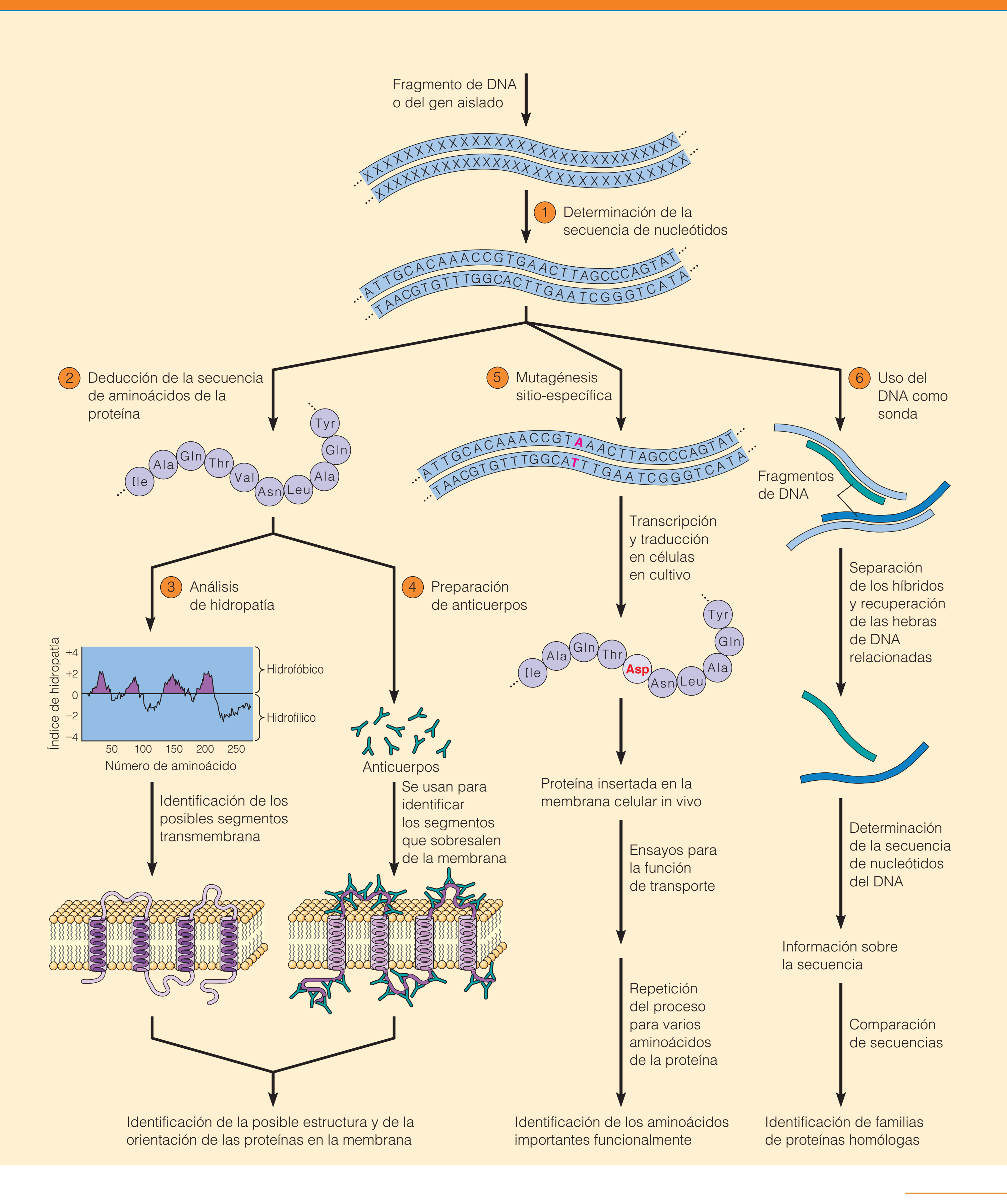
A pesar de los éxitos con éstos y otros abordajes similares, los biólogos de membrana, a veces se bloquean en sus intentos de aislar, purificar y estudiar las proteínas de membrana. A menudo, las técnicas bioquímicas que funcionan muy bien para proteínas solubles, no son útiles para proteínas hidrofóbicas. Sin embargo, en las tres últimas décadas, el estudio de las proteínas de membrana ha sufrido una revolución gracias a las técnicas de biología molecular, especialmente gracias a la *secuenciación del DNA* y a las *técnicas de DNA recombinante.* Consideraremos estas técnicas en detalle en los Capítulos 18 y 20, pero no necesitamos esperar hasta entonces para apreciar el enorme impacto que la biología molecular ha tenido en el estudio de las membranas y de las proteínas de membrana. En la Figura 7A.1, se resumen varias aproximaciones al problema que han demostrado ser especialmente útiles.

Para todos estos abordajes, ha sido vital el aislamiento de un gen o al menos de un fragmento, que codifique para una proteína de membrana específica (Figura 7A.1, parte superior). Con una molécula de DNA en la mano, la primera prioridad del biólogo molecular es, casi siempre, determinar su secuencia de nucleótidos ①. De hecho, la *secuenciación del DNA* es uno de los triunfos de la biología molecular; ahora es mucho más sencillo determinar la secuencia de nucleótidos de una molécula de DNA que la secuencia de aminoácidos de la proteína a la que codifica. Además, la mayor parte del procedimiento de secuenciación se lleva a acabo de manera rápida y automática por las máquinas de secuenciación de DNA. Una vez que se ha secuenciado el DNA para una proteína en particular, se debe deducir, usando el código genético que compara cada posible secuencia de tres nucleótidos con un aminoácido en particular (*véase* Figura 21.8), la *secuencia de aminoácidos* predecible o *probable* de esa proteína ②. La secuencia de aminoácidos se puede someter al *análisis hidropático* (*véase* Figura 7.23) para identificar en la proteína, los segmentos transmembrana más probables ③.

Conocer la secuencia de aminoácidos, también le permite al investigador preparar péptidos sintéticos que correspondan a segmentos específicos de la proteína ④. Los anticuerpos producidos contra estos péptidos se pueden marcar radiactivamente y usarse para determinar qué segmentos están expuestos a cada lado de la membrana. La información conseguida por esta vía, combinada con los datos de la hidropatía, a menudo proporcionan pruebas convincentes sobre la estructura más probable de una proteína y su orientación en la membrana y también posiblemente sobre su mecanismo de acción. Por ejemplo, la estructura de la proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) que está dañada en las personas con fibrosis quística, se determinó de esta manera (*véase* Anexo 8B).

Otra técnica molecular potente, denominada **mutagénesis sitio-específica**, se utiliza para examinar el efecto de cambios

Figura 7A-1 (Página opuesta) Aplicación de las técnicas de biología molecular para el estudio de las proteínas de membrana. La mayoría de los abordajes moleculares comienzan con un fragmento aislado de DNA que corresponde al gen o a una parte del gen de una proteína y que se obtiene por los métodos que se tratarán en el Capítulo 20. ① La secuencia de nucleótidos del DNA se determina normalmente mediante un secuenciador automático rápido. ② La secuencia de aminoácidos de la proteína se deduce fácilmente utilizando el código genético. La secuencia deducida se utiliza en ③ el análisis de hidropatía para determinar la frecuencia y localización de posibles ④ segmentos transmembrana. La mutagénesis ⑤ sitio-específica se utiliza para hacer cambios específicos en la secuencia de DNA y por tanto, en la secuencia de aminoácidos de la proteína; las propiedades de la proteína mutante resultante se estudiarán para identificar aminoácidos o segmentos de la proteína importantes funcionalmente. ⑥ El DNA aislado se puede utilizar también como sonda para identificar secuencias de DNA relacionadas en el mismo o con otros genomas. Presumiblemente, tales DNAs corresponden a genes de proteínas que están relacionadas estructuralmente o quizás también funcional y evolutivamente.


Fragmento de DNA o del gen aislado
1 Determinación de la secuencia de nucleótidos
ATTGCACAAACCGTGAACTTAGCCCAGTAT
TAACGTGTTTGGCACTTGAATCGGGTCATA
2 Deducción de la secuencia de aminoácidos de la proteína
Ile Ala Gln Thr Val Asn Leu Ala Gln Tyr
3 Análisis de hidropatía
Índice de hidropatía
Hidrofóbico
Hidrofílico
Número de aminoácido
Identificación de los posibles segmentos transmembrana
4 Preparación de anticuerpos
Anticuerpos
Se usan para identificar los segmentos que sobresalen de la membrana
Identificación de la posible estructura y de la orientación de las proteínas en la membrana
5 Mutagénesis sitio-específica
ATTGCACAAACCGTAAACTTAGCCCAGTAT
TAACGTGTTTGGCATTTGAATCGGGTCATA
Transcripción y traducción en células en cultivo
Ile Ala Gln Thr Asp Asn Leu Ala Gln Tyr
Proteína insertada en la membrana celular in vivo
Ensayos para la función de transporte
Repetición del proceso para varios aminoácidos de la proteína
Identificación de los aminoácidos importantes funcionalmente
6 Uso del DNA como sonda
Fragmentos de DNA
Separación de los híbridos y recuperación de las hebras de DNA relacionadas
Determinación de la secuencia de nucleótidos del DNA
Información sobre la secuencia
Comparación de secuencias
Identificación de familias de proteínas homólogas

específicos realizados en la secuencia de aminoácidos de una proteína ⑤. La secuencia de DNA que codifica para un segmento específico de una proteína, se puede alterar cambiando nucleótidos concretos. El mRNA que se transcribe a partir de un DNA mutado se inyecta en células vivas (en células de mamífero en cultivo o en ovocitos de anfibios). Las células utilizan el mRNA para dirigir la síntesis de una proteína mutada, de esta forma, se determinará con facilidad sus propiedades funcionales. Asimismo, se identificarán los aminoácidos con importancia funcional.

Otra forma de utilizar genes aislados o segmentos de genes es como *sondas de DNA,* utilizadas para aislar otras secuencias de DNA similares a esa sonda ⑥. El DNA que se identifica de esta forma, probablemente codifica proteínas que son estructuralmente similares a la proteína para la que codifica la sonda de DNA. Es probable que tales proteínas estén relacionadas entre sí, tanto por su origen evolutivo como, posiblemente, por su mecanismo de acción.

Con la llegada de técnicas para secuenciar genomas completos, de las que trataremos en el Capítulo 18, los investigadores pueden buscar genomas completos para secuencias nucleotídicas similares a otras, ya conocidas, que codifican para proteínas específicas. De esta forma, se pueden identificar grupos o *familias* de proteínas relacionadas. El uso de bases de datos computerizadas ha sido extraordinariamente valioso para sugerir el papel que desempeñan las proteínas, basándose en sus secuencias génicas.

A partir de estudios que se basan en estas técnicas y en otras, ahora sabemos que las células del cuerpo humano necesitan más de 30 familias de proteínas de membrana para facilitar el transporte de una gran variedad de solutos que se mueven a través de las membranas. Además, las familias, a menudo, contienen muchas proteínas diferentes, aunque relacionadas. Incluso, un único miembro de una de estas familias puede estar presente en variedad de formas que difieren en propiedades como, tiempo de expresión durante el desarrollo, distribución tisular o localización en la célula. Luego, quizás, no debamos sorprendernos, al saber que los genes que conocemos que codifican para proteínas de transporte ¡representan aproximadamente el 10% del genoma humano!

La mayoría de estos abordajes moleculares son indirectos, en el sentido de que permiten a los científicos deducir propiedades y funciones de las proteínas más que probarlas directamente. Sin embargo, estas técnicas son armas potentes que ya han tenido un gran impacto sobre nuestro conocimiento de las proteínas de membrana. Casi con certeza, continuarán revolucionando el estudio de las membranas y de sus proteínas.

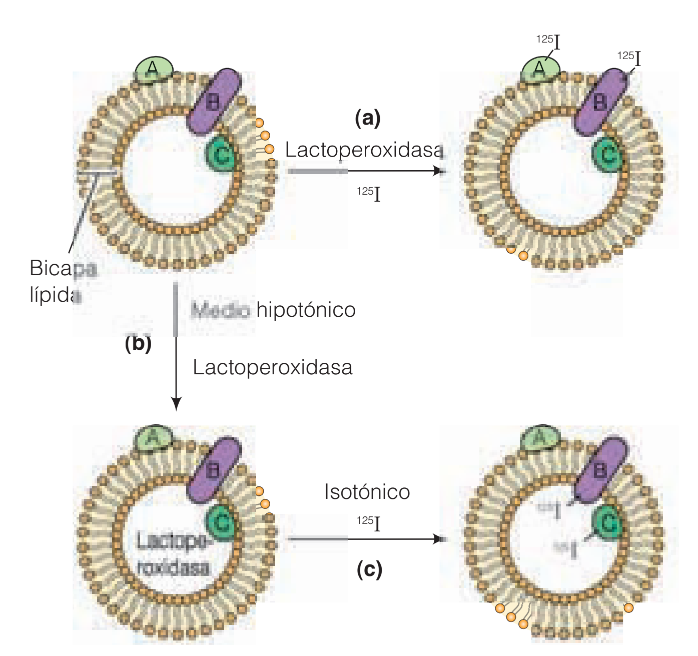


Figura 7.24 Un método para marcar proteínas expuestas en una o en ambas superficies de la membrana de una vesícula. (**a**) Cuando la lactoperoxidasa (LP) y el ^{125}I están presentes en solución en el exterior de la membrana de la vesícula, la LP cataliza el marcaje de las proteínas de la superficie externa de la membrana (es decir, proteínas A y B). Si las vesículas de membrana (**b**) se incuban primero en un medio hipotónico para hacerlas permeables a la LP y (**c**) se transfieren a una solución isotónica que contiene ^{125}I pero no LP externa, las proteínas expuestas en la superficie interna de la membrana (es decir, proteínas B y C) se marcan.

sobre la superficie interna de la membrana, sólo sobre la superficie externa o en ambas superficies.

En un abordaje similar, la enzima *galactosa oxidasa (GO)* se utiliza para marcar cadenas laterales de carbohidratos que están ancladas a proteínas o lípidos de membrana. Las vesículas se tratan primero con GO que oxida los residuos de galactosa de las cadenas laterales de los carbohidratos. Las vesículas se exponen, entonces, a borohidrido tritiado (^{3}H-BH$_4$) que reduce los grupos de la galactosa, introduciendo en el proceso, átomos de hidrógeno marcados. Para explorar estas técnicas en profundidad, intente resolver los Problemas 7.11 y 7.12 que están al final del capítulo.

Se puede determinar la orientación de una proteína dentro de una membrana utilizando anticuerpos diseñados para reconocer partes específicas de una proteína. Las células intactas (u orgánulos) se exponen a estos anticuerpos y posteriormente se determina si los anticuerpos se han unido a la membrana. Si lo han hecho, se puede concluir que el sitio de unión del anticuerpo, o *epitopo*, está en la superficie externa de la membrana. La orientación de las proteínas de membrana se crea cuando la proteína se inserta en ésta durante la biogénesis de la membrana, y se mantiene debido a las restricciones termodinámicas que impiden la difusión transversal. El resultado es una membrana en donde las moléculas de lípidos y proteínas presentes en cada lado de la membrana son diferentes de los del otro lado. Como resultado de todo esto, las membranas

son *asimétricas funcionalmente*, en el sentido de que las reacciones y los procesos que ocurren en un lado de la membrana son, en general, bastante diferentes de las actividades que se producen en el otro lado.

Muchas proteínas de membrana están glicosiladas

Además de lípidos y proteínas, la mayoría de las membranas contienen cantidades, pequeñas pero significativas de carbohidratos. La membrana plasmática del eritrocito humano, por ejemplo, contiene alrededor del 52% de proteínas, 40% de lípidos y un 8% de carbohidratos en peso. Los glicolípidos que hemos comentado previamente representan una pequeña porción de los carbohidratos de membrana ya que la mayoría están en forma de **glicoproteínas**, proteínas de membrana con cadenas de carbohidratos unidas covalentemente a cadenas laterales de aminoácidos.

La adición de una cadena lateral hidrocarbonada a una proteína se denomina **glicosilación**. Como muestra la Figura 7.25, la glicosilación implica el enlace del carbohidrato al átomo de nitrógeno de un grupo amino (*N-glicosilación*) o al átomo de oxígeno de un grupo hidroxilo (*O-glicosilación*). Los carbohidratos ligados a N están anclados al grupo amino de la cadena lateral de una asparagina (Figura 7.25a) mientras que los carbohidratos ligados a O están normalmente unidos a los grupos hidroxilo de serina o de treonina (Figura 7.25b). En algunos casos los carbohidratos ligados a O están unidos a un grupo hidroxilo de hidroxilisina o de hidroxiprolina, que son derivados de los aminoácidos lisina y prolina, respectivamente (Figura 7.25c).

Las cadenas de carbohidratos unidas a las glicoproteínas pueden ser lineales o ramificadas y varían en longitud de 2 a 60 residuos de azúcar. Los azúcares más utilizados habitualmente para construir estas cadenas son *galactosa*, *manosa*, *N-acetilglucosamina* y *ácido siálico* (Figura 7.26a). La Figura 7.26b muestra la cadena de carbohidratos presente en la proteína glicoforina, localizada en la membrana plasmática de los eritrocitos. Esta proteína integral de membrana tiene 16 cadenas de carbohidratos unidas al (extremo N-terminal) de la molécula que se orienta hacia el exterior de la membrana del eritrocito; de estas 16 cadenas, 1 está ligada a un grupo N y 15 están ligadas a grupos O. Fíjese que ambas ramas de la cadena de carbohidratos terminan en un ácido siálico cargado negativamente. Debido a estos grupos aniónicos en su superficie, los eritrocitos se repelen, reduciendo de esta forma la viscosidad de la sangre.

Las glicoproteínas predominan en las membranas plasmáticas, donde desempeñan un papel importante en el reconocimiento intercelular. Consecuentes con este papel, las glicoproteínas están siempre situadas de tal forma que los grupos carbohidrato sobresalen de la superficie externa de la membrana celular. Esta disposición que contribuye a la asimetría de la membrana, se ha demostrado experi-

H—N O H
CH—CH_2—C—N—O—O
O=C Asparagina
Grupo carbohidrato

(a) Unido en N (al grupo amino de la asparagina)

H—N
CH—CH_2—O—O—O
O=C Serina

H—N CH_3
CH—CH
O=C O—O—O
Treonina

(b) Unido en O (al grupo hidroxilo de serina o treonina)

$^{+}NH_3$
CH_2
H—N
CH—CH_2—CH_2—CH
O=C Hidroxilisina O—O—O

N—CH_2
CH—O—O—O
CH
CH_2
O=C Hidroxiprolina

(c) Unido en O (al grupo hidroxilo de hidroxilisina o hidroxiprolina)

Figura 7.25 Glicosilación en N y en O de las proteínas de membrana. Los grupos carbohidrato están unidos a las proteínas de membrana de dos formas distintas. En cada caso el aminoácido que se muestra es parte de la estructura primaria de una proteína de membrana. (**a**) Los carbohidratos unidos en N están anclados al grupo amino de la cadena lateral de la asparagina mediante enlaces amida. (**b**) Los carbohidratos unidos en O están unidos al grupo hidroxilo de las cadenas laterales de serina o de treonina mediante enlaces éster. (**c**) en algunos casos, los carbohidratos unidos en O están ligados al grupo hidroxilo de los aminoácidos modificados hidroxilisina e hidroxiprolina.

CH_2OH / HO, OH, H, OH H, H, H OH

β-D-galactosa
(Gal)

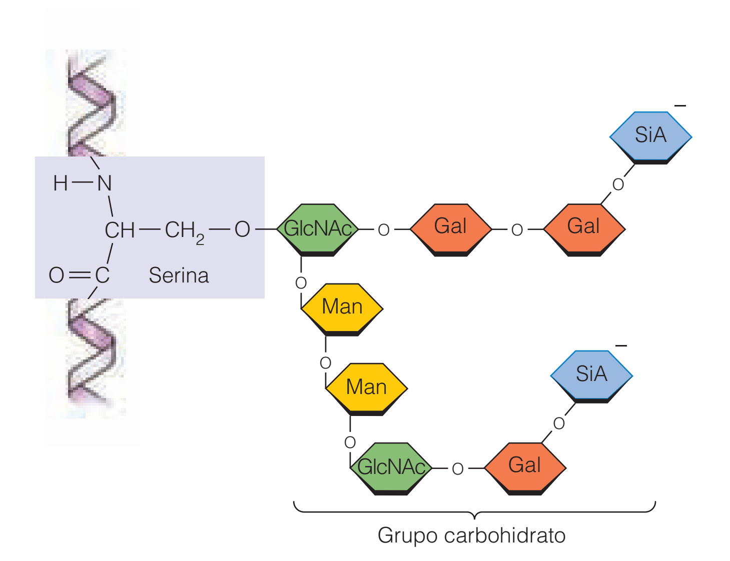
β-D-manosa
(Man)

N-acetil-β-D-glucosamina
(GlcNAc)

Ácido siálico
(SiA)

R = H—C—OH, H—C—OH, CH_2OH

(a) Azúcares encontrados habitualmente en las glicoproteínas



(b) El grupo carbohidrato de la glicoforina

Figura 7.26 Ejemplos de carbohidratos presentes en las glicoproteínas. **(a)** Los cuatro carbohidratos más comunes de las glicoproteínas son galactosa (Gal), manosa (Man), *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico (SiA). **(b)** Por ejemplo, 15 de las 16 cadenas de carbohidratos de las glicoforinas están unidas al aminoácido serina en la porción hidrofílica de la proteína de la superficie de la membrana plasmática del eritrocito. Cada una de estas cadenas carbohidratadas consta de tres unidades de Gal y dos unidades de GlcNAc, dos de Man y otras dos de SiA. Los dos grupos terminales de ácido siálico están cargados negativamente.

mentalmente utilizando *lectinas*, proteínas de plantas que se unen específica y fuertemente a azúcares. Por ejemplo, la *aglutinina del germen de trigo*, una lectina encontrada en los embriones del trigo se une muy específicamente a oligosacáridos que terminan en *N*-acetilglucosamina, mientras que la *concanavalina A*, una lectina de las habichuelas ***Canavalia ensiformis***, reconoce los grupos de manosa de posiciones internas. Los investigadores visualizan estas lectinas uniéndolas a *ferritina*, una proteína que contiene hierro y que al microscopio electrónico se observa como una mancha electrón-densa. Cuando tales lectinas unidas a ferritina se utilizan como sondas para localizar cadenas oligosacáridas de glicoproteínas de membrana, la unión se realiza siempre, y de forma específica, por la superficie externa de la membrana plasmática.

En muchas células animales, los grupos carbohidrato de las glicoproteínas y de los glicolípidos de membrana sobresalen de la superficie celular y forman una cubierta de superficie denominada **glicocálix** (que significa «cubierta de azúcar»). La Figura 7.27 muestra el glicocálix prominente de una célula epitelial intestinal. Los grupos carbohidrato de la superficie celular constituyen zonas de reconocimiento tanto para los receptores de membrana implicados en la unión de moléculas de señalización extracelular, como en reacciones antígeno-anticuerpo o como en procesos de adhesión intercelular para la formación de tejidos.

Las proteínas de membrana varían en cuanto a su movilidad

Previamente en el capítulo hemos comentado que las moléculas de lípidos pueden difundir lateralmente dentro del plano de la membrana (*véase* Figura 7.11). Ahora podemos hacernos la misma pregunta con respecto a las proteínas de membrana: ¿Se mueven libremente en la membrana? De hecho, las proteínas de la membrana, son mucho más variables que los lípidos en cuanto a su movilidad. Algunas proteínas parece que se mueven libremente dentro de la bicapa lipídica, mientras que otras están constreñidas, a menudo porque están ancladas a complejos proteicos adyacentes localizados a un lado u otro de la membrana.

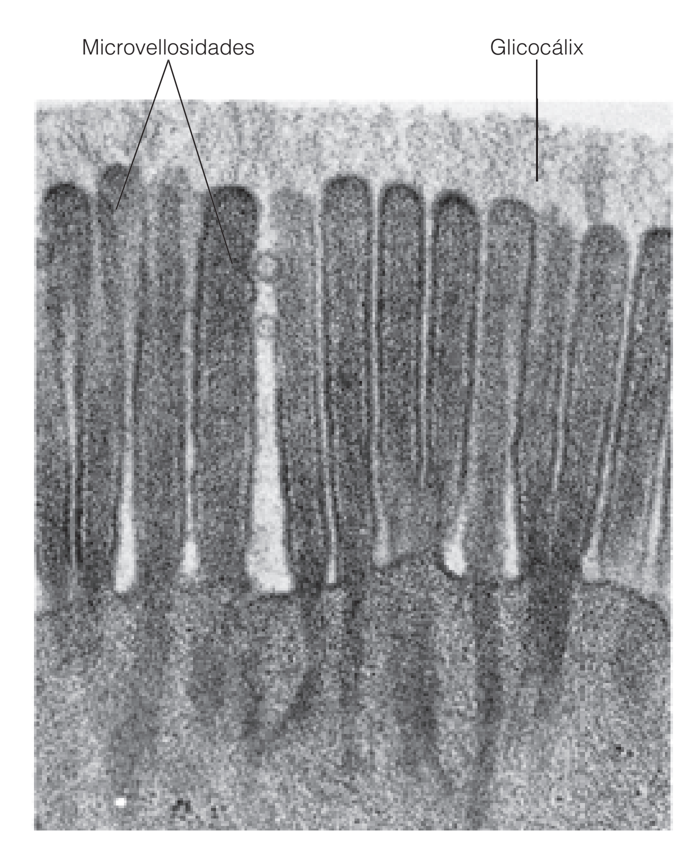


Figura 7.27 Glicocálix de una célula epitelial intestinal. Esta micrografía electrónica de una célula epitelial intestinal muestra las microvellosidades (proyecciones con forma de dedo implicadas en procesos de absorción) y el glicocálix sobre la superficie celular. El glicocálix en esta célula tiene un espesor de 150 nm y consiste principalmente en cadenas oligosacáridas de entre 1,2-1,5 nm de diámetro (MET).

Evidencias experimentales de la movilidad proteica. Los *experimentos de fusión celular* como los que se resumen en la Figura 7.28 aportan evidencias particularmente convincentes con respecto a la movilidad, de por lo menos, algunas proteínas de membrana. En estos estudios David Frye y Michael Edidin aprovecharon dos técnicas potentes, una que les permitía fusionar células de dos especies diferentes y otra que les permitía marcar o etiquetar, las superficies de las células con marcadores fluorescentes. Su abordaje consistía en fusionar células humanas y de ratón para identificar las proteínas específicas de cada especie en la superficie de las células fusionadas. Para ello, se marcaron con **anticuerpos fluorescentes** —anticuerpos que se habían unido con dos clases diferentes de marcadores fluorescentes—. Posteriormente, las células fusionadas se observaron con un microscopio de fluorescencia, para ver lo que les pasaba a las proteínas de la membrana plasmática que habían servido como marcadores de los dos tipos diferentes de células parentales.

Los anticuerpos necesarios para este tipo de experimento se prepararon inyectando pequeñas cantidades de proteínas de membrana purificadas, humanas o de ratón, a diferentes animales de experimentación. (Los conejos y las cabras son los que se usan normalmente para este propósito.) Los animales respondían inmunológicamente a la proteína extraña produciendo *anticuerpos* que reaccionan específicamente con las proteínas de membrana utilizadas en las inyecciones. Después de aislar el anticuerpo de la sangre del animal, se une covalentemente a colorantes fluorescentes de forma que los complejos proteína/anticuerpo/colorante puedan ser visualizados con un microscopio.

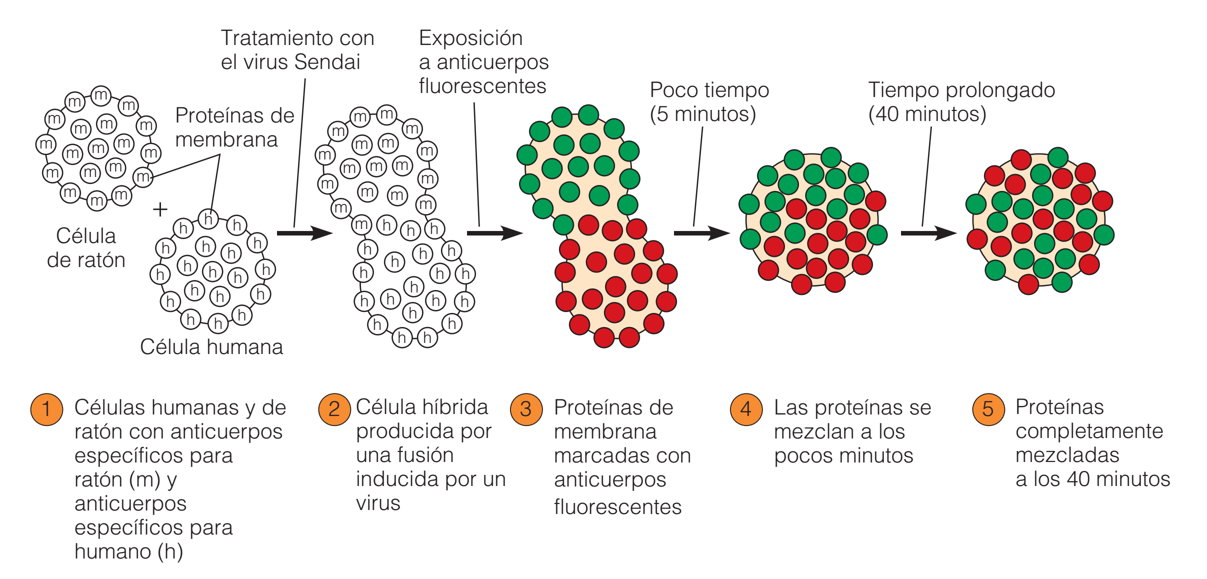
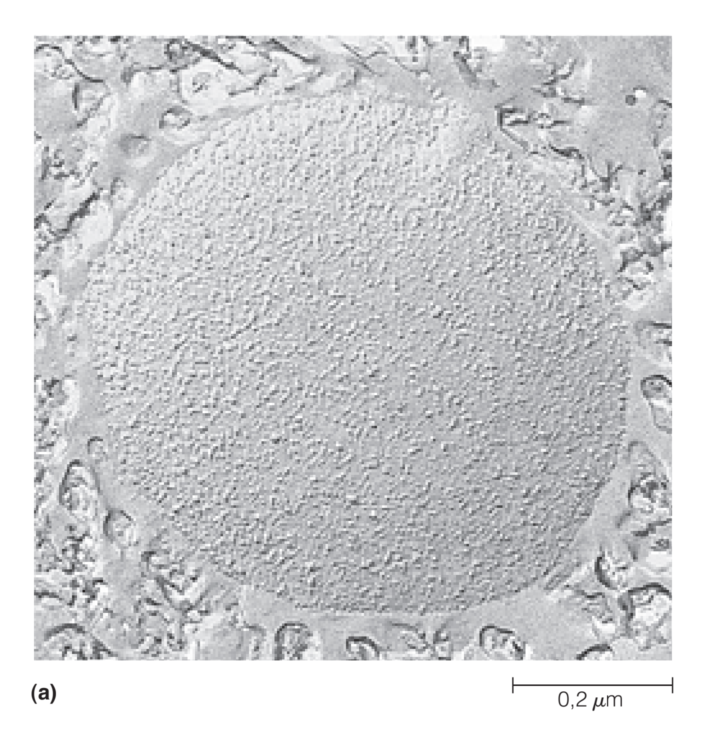


Figura 7.28 Demostración de la movilidad de las proteínas de membrana por fusión celular. La movilidad de las proteínas de membrana se puede demostrar de manera experimental por la mezcla de proteínas de membrana que se produce cuando células de dos especies diferentes (ratón y humano) se fusionan y las proteínas de membrana se marcan con dos juegos de anticuerpos fluorescentes, uno específico para las proteínas de la membrana de ratón y ligado a un colorante verde y el otro específico para las proteínas de la membrana humana y ligadas a un colorante rojo. Las proteínas empiezan a mezclarse en pocos minutos y se mezclan casi completamente a los 40 minutos.

Frye y Edidin marcaron las proteínas de membrana plasmática humana y de ratón con anticuerpos que tenían unidos marcadores de dos colores diferentes, de tal forma que los dos tipos de proteínas se distinguirían por el color de su fluorescencia. Las células de ratón reaccionaron con anticuerpos específicos para ratón unidos a un colorante fluorescente verde denominado *fluoresceína*, mientras que las células humanas reaccionaron con anticuerpos específicos para humanos unidos a un colorante fluorescente rojo, *rodamina* (Figura 7.28).

Para fusionar las células humanas y de ratón, las trataron con el virus Sendai, un agente conocido por su capacidad para fusionar las células eucariotas, incluso aquéllas de especies diferentes. Las células fusionadas se expusieron entonces a los anticuerpos fluorescentes rojos y verdes y se observaron al microscopio de fluorescencia. Cuando las células fusionadas se expusieron por primera vez a los anticuerpos, las proteínas de la membrana del ratón con el colorante fluorescente verde se localizaron en una de las dos mitades de la superficie de la célula híbrida, mientras que las proteínas de membrana con el colorante fluorescente rojo derivadas de las células humanas se mantuvieron restringidas a la otra mitad de la superficie celular (*véase* Figura 7.28). Sin embargo, a los pocos minutos, las proteínas de las dos células parentales empezaron a entremezclarse, y a los 40 minutos, las regiones separadas con fluorescencia verde y roja estaban completamente entremezcladas. Si se reducía la fluidez de la membrana, disminuyendo la temperatura por debajo de la temperatura de transición de la bicapa lipídica, se impedía la mezcla. Por eso, Frye y Edidin concluyeron que la mezcla de proteínas fluorescentes había sido causada por la difusión lateral de las proteínas humanas y de ratón a través de la bicapa lipídica fluida de la membrana plasmática. Sin embargo, comparadas con la mayoría de los lípidos de membrana, las proteínas de membrana difunden mucho más lentamente a través de la bicapa lipídica.

Si las proteínas fueran completamente libres para difundir dentro del plano de la membrana, entonces deberían estar distribuidas al azar. La microscopía electrónica aplicada a la criofractura, que directamente visualiza las proteínas incluidas en la bicapa, apoya la idea de que al menos algunas proteínas de membrana, se comportan de esta forma. Cuando se examinan micrografías de criofracturas de membranas plasmáticas, las partículas proteicas incluidas en ella suelen estar, a menudo, distribuidas al azar. Tales evidencias con respecto a la movilidad de las proteínas no se restringen a la membrana plasmática. También se ha descubierto que las partículas proteicas de la membrana mitocondrial interna están ordenadas al azar (Figura 7.29a). Si se exponen vesículas de membrana mitocondrial aisladas a un potencial eléctrico, las partículas proteicas que tengan carga neta negativa, se moverán hacia uno de los extremos de la vesícula. Si el potencial eléctrico se elimina, las partículas se distribuyen otra vez al azar, indicando que todas estas proteínas son libres de moverse en



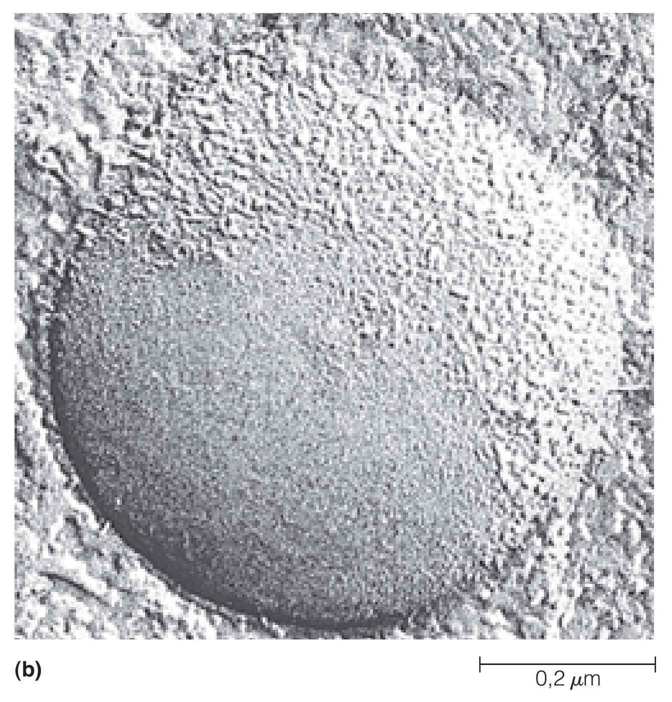


Figura 7.29 Evidencia de la movilidad de las proteínas de membrana. (**a**) Micrografía de criofractura que muestra la distribución al azar de partículas proteícas en vesículas preparadas a partir de la membrana mitocondrial interna. (**b**) La exposición de las vesículas a un campo eléctrico causa que las partículas de membrana migren a un extremo de la vesícula (extremo superior derecha de la micrografía). Si las proteínas de membrana no fueran móviles, este movimiento de las proteínas hacia un lado de la vesícula no sucedería).

la bicapa lipídica. Volveremos a esta evidencia en el Capítulo 10, donde aprenderemos que la transferencia de electrones en la membrana mitocondrial interna depende de las colisiones al azar que se producen entre complejos móviles de proteínas de membrana.

Evidencia experimental de movilidad restringida. Aunque se ha demostrado que muchos tipos de proteínas de membrana difunden a través de la bicapa lipídica, sus velocidades de movimiento varían. Un abordaje utilizado ampliamente para cuantificar las velocidad a las que difunden las proteínas de membrana es la recuperación de fluorescencia después de un foto-blanqueamiento, técnica que ya hemos tratado en el contexto de la movilidad lipídica (*véase* Figura 7.11). Para calcular la velocidad de difusión de distintos tipos de moléculas fluorescentes lipídicas y proteícas, se puede utilizar la velocidad a la que se mueven hacia el área blanqueada, moléculas de membrana no decoloradas procedentes de partes adyacentes a la zona tratada.

Las proteínas de la membrana son mucho más variables en su velocidad de difusión que los lípidos. Existen unas pocas proteínas de membrana que difunden casi tan rápidamente como los lípidos, pero la mayoría difunden más lentamente de lo que cabría esperar si fuesen completamente libres para moverse en la bicapa lipídica. Además, la difusión de muchas proteínas de membrana está restringida a un área limitada, indicando que, por lo menos, algunas membranas constan de una serie de *dominios de membrana* separados, que difieren en su composición proteica y por lo tanto en sus funciones. Por ejemplo, las células que limitan su intestino delgado tienen proteínas de membrana que transportan solutos tales como azúcares y aminoácidos, que sacan del intestino y los introducen en el cuerpo. Estas proteínas de transporte están restringidas en el lado de la célula en donde se requiere cada uno de los tipos de transporte correspondiente (*véase* Figura 7.22). Las células en las que las proteínas de membrana están restringidas a una parte específica de la membrana celular se denominan *células polarizadas*.

Mecanismos para restringir la movilidad de las proteínas. Existen varios mecanismos diferentes responsables de la restricción de la movilidad de las proteínas y por tanto de la polarización celular. En algunos casos, las proteínas de membrana se agregan dentro de la membrana formando complejos grandes que se mueven perezosamente, si es que lo hacen. En otros casos, las proteínas de membrana forman estructuras que se transforman en barreras que impiden la difusión de otras proteínas de membrana, creando de este modo, dominios de membrana específicos; las *uniones estrechas* que se comentarán en el Capítulo 17 son un ejemplo. Sin embargo, el impedimento más habitual en la movilidad de las proteínas de membrana, viene impuesto por la unión o *anclaje* de esas proteínas a estructuras adyacentes localizadas a un lado u otro de la membrana. Por ejemplo, muchas proteínas de la membrana plasmática están ancladas o bien a elementos del citoesqueleto de la superficie interna de la membrana o bien a estructuras extracelulares tales como la matriz extracelular de las células animales. Comentaremos ambos mecanismos de anclaje en el Capítulo 17.

Perspectiva

Las células necesitan membranas para definir y compartimentalizar los espacios, para facilitar y regular el flujo de materiales, para detectar señales externas y para mediar las interacciones entre las células. Nuestro conocimiento actual de la estructura de la membrana representa la culminación de más de un siglo de estudios, que empezó con el reconocimiento de que los lípidos son un componente importante de la membrana y que fue avanzando progresivamente desde la idea de una monocapa lipídica a una bicapa fosfolipídica. Una vez que se reconoció que las proteínas eran otro componente importante, Davson y Danielli propusieron su modelo de «sándwich» en donde la bicapa lipídica estaba rodeada en los dos lados por capas de proteínas. Este modelo estimuló las investigaciones y se aplicó a la variedad de membranas revelada por la microscopía electrónica. Sin embargo, a medida que las membranas y las proteínas de membrana se examinaron con mayor detalle, el modelo del «sandwich» fue cada vez más cuestionado y finalmente fue desacreditado.

En su lugar surgió el modelo del mosaico fluido de Singer y Nicholson que en la actualidad es la descripción aceptada universalmente sobre la estructura de la membrana. De acuerdo con este modelo, proteínas con diferente afinidad por el interior hidrofóbico de la membrana flotan en y sobre una bicapa lipídica fluida. La mayoría de las membranas incluyen entre sus principales lípidos fosfolípidos (tanto fosfoglicéridos como fosfoesfingolípidos) y glicolípidos tanto cerebrósidos como gangliósidos. En las células eucariotas, los esteroles son también componentes importantes de la membrana; entre éstos se incluye el colesterol en las células animales y varios fitoesteroles relacionados con él en las células vegetales. Los esteroles no se encuentran en las membranas de los procariotas, pero al menos algunas células bacterianas contienen algunos compuestos parecidos denominados hopanoides.

En términos de su asociación con la bicapa lipídica, las proteínas de membrana se clasifican en integrales, periféricas o ancladas a lípidos. Las proteínas integrales de membrana tienen uno o más segmentos cortos con predominio de aminoácidos hidrofóbicos que anclan las proteínas a la membrana. En la mayoría de los casos, éstos son segmentos transmembrana, de tal manera que porciones

de la proteína estarán expuestas a ambos lados. La mayoría de estos segmentos transmembrana son secuencias en α-hélice de entre 20 y 30 aminoácidos predominantemente hidrofóbicos. Las proteínas periféricas de membrana son hidrofílicas y se mantienen en la superficie de la membrana. Las proteínas ancladas a lípidos son también de naturaleza hidrofílica pero están unidas covalentemente a la membrana por cualquiera de los diferentes anclajes lipídicos que están incluidos en la bicapa lipídica.

La mayoría de los fosfolípidos y proteínas de la membrana son libres para moverse en el plano de la membrana si no están específicamente anclados a estructuras de la superficie interna o externa de la membrana. De manera general, la difusión transversal o «flip-flop» entre monocapas, no es posible para los fosfolípidos excepto cuando está catalizada por enzimas denominadas translocadores fosfolipídicos o flipasas. El resultado es que la mayoría de las membranas se caracterizan por presentar una distribución asimétrica de lípidos entre las dos monocapas y una orientación asimétrica de las proteínas en las membranas, de manera que los dos lados de la membrana son distintos estructural y funcionalmente.

Las proteínas de membrana funcionan como enzimas, transportadores de electrones, moléculas de transporte y receptores de señales químicas como neurotransmisores y hormonas. Las proteínas de membrana también estabilizan y dan forma a la membrana y median en la comunicación intercelular y la adhesión intercelular. Muchas proteínas de la membrana plasmática son glicoproteínas, con cadenas laterales de carbohidratos que sobresalen de la membrana por el lado externo, en donde desempeñan un papel importante como marcadores de reconocimiento en la superficie celular.

Con el conocimiento de la estructura y función de la membrana que hemos adquirido en este capítulo, ya estamos preparados para explorar los mecanismos por los cuales solutos y señales se mueven a través de las membranas. Para esta discusión recogemos nuestras membranas y pasamos al Capítulo 8.

Problemas

Los problemas de mayor dificultad están marcados con un •.

7.1 Función de las membranas. Especifique a cuál de las cinco funciones generales de la membrana (barrera de permeabilidad, localización y función, regulación del transporte, detección de señales, o comunicación celular) hace alusión cada una de las siguientes aseveraciones.

- **(a)** Cuando las células se desorganizan y se fraccionan en sus componentes subcelulares, la enzima citocromo P-450 se recupera con la fracción del retículo endoplasmático.
- **(b)** Las células de un organismo multicelular portan en su superficie externa glicoproteínas específicas de tejido que son responsables de la adhesión intercelular.
- **(c)** El interior de una membrana está integrado principalmente por las porciones hidrofóbicas de los fosfolípidos y de las proteínas anfipáticas.
- **(d)** Los fotosistemas I y II están incluidos en la membrana del tilacoide del cloroplasto.
- **(e)** Toda la fosfatasa ácida de una célula de mamífero se encuentra en los lisosomas.
- **(f)** La membrana de una célula de la raíz de una planta tiene una bomba de iones que intercambia fosfato hacia el interior celular por bicarbonato que sale al exterior.
- **(g)** La membrana mitocondrial interna contiene una proteína transportadora de ATP y ADP que acopla el movimiento del ATP hacia el exterior con el movimiento del ADP hacia el interior.
- **(h)** La insulina no entra en la célula diana, en vez de eso, se une a un receptor de membrana específico situado en la superficie externa de ésta, activando así a la enzima adenilato ciclasa que está situada en la superficie interna de la membrana.
- **(i)** Las células adyacentes de plantas intercambian con frecuencia componentes citoplasmáticos a través de canales, denominados plasmodesmos, que surcan las membranas.

7.2 Explicación de la estructura de la membrana. Cada una de las siguientes observaciones desempeña un papel importante para mejorar nuestro conocimiento sobre la estructura de la membrana. Explique el significado de cada una de ellas, e indique en qué década del cronograma que se muestra en la Figura 7.3 es más probable que se realizase esa observación.

- **(a)** Cuando se observa una membrana al microscopio electrónico las dos líneas finas y electrodensas tienen un espesor de aproximadamente 2 nm, pero con frecuencia tienen un aspecto claramente distinto.
- **(b)** La etilurea penetra mucho más fácilmente en una membrana que la urea, y la dietilurea penetra todavía con mayor facilidad.
- **(c)** La adicción de fosfolipasa a una célula viva causa una rápida digestión de las bicapas lipídicas de las membranas, lo que sugiere que la enzima tiene acceso a los fosfolípidos de la membrana.
- **(d)** Cuando se someten bicapas lipídicas artificiales a un análisis con criofractura, no se observan partículas en ninguna cara.
- **(e)** La resistividad eléctrica de las bicapas lipídicas artificiales es varios órdenes de magnitud mayor que la de las membranas reales.
- **(f)** Algunas proteínas de membrana se extraen con facilidad con NaCl 1*M*, mientras que otras requieren el uso de un solvente orgánico o de un detergente.
- **(g)** Cuando las halobacterias crecen en ausencia de oxígeno producen un pigmento púrpura que se incluye en su membrana plasmática y que tiene la capacidad de bombear protones hacia el exterior celular cuando se ilumina. Si las membranas púrpura se aíslan, se realiza una criofractura y se observan al microscopio electrónico se encuentran manchas de partículas cristalinas.

7.3 Volver a Gorter y Grendel. Las conclusiones clásicas de Gorter y Grendel de que la membrana plasmática del eritrocito humano consistía en una bicapa lipídica se basaron en las siguientes observaciones: (i) los lípidos que extrajeron con acetona a partir de $4{,}74 \times 10^9$ eritrocitos, formaban una

monocapa con un área de 0,89 m^2 que se expandía en una superficie acuosa; y (ii) el área superficial de un eritrocito era de aproximadamente 100 μm^2 según sus medidas.

(a) Demuestre a partir de estos datos cómo llegaron a la conclusión de que la membrana del eritrocito es una bicapa.

(b) Ahora sabemos que el área superficial del eritrocito humano es de aproximadamente 145 μm^2. Explique cómo Gorter y Grentel pudieron llegar a la conclusión correcta cuando una de sus medidas era solamente dos tercios del valor correcto.

7.4 Lípidos, proteínas y bicapas en los eritrocitos. La membrana de un eritrocito humano tiene un área superficial de aproximadamente 145 μm^2 y un espesor de aproximadamente 8 nm. Contiene unos 0,52 picogramos de lípidos y unos 0,60 picogramos de proteína. (1 picogramo equivale a 1×10^{-12} g.) Suponga que existen cantidades equimoleculares de colesterol y de fosfolípidos con un peso molecular de 386 y de aproximadamente 800, respectivamente. En una monocapa, cada molécula de fosfolípido ocupa un área superficial de 0,55 nm^2 por molécula y cada molécula de colesterol ocupa 0,38 nm^2 por molécula.

(a) Asumiendo que las proteínas de membrana tienen un peso molecular aproximado de 50.000, ¿cuántas moléculas de proteína hay en una única membrana de eritrocito?

(b) ¿Cuál es la proporción de moléculas de lípido frente a moléculas de proteína en la membrana del eritrocito?

(c) ¿Qué proporción del área de la superficie del eritrocito está ocupada por los lípidos de la bicapa?

7.5 Acerca del tamaño. Por la química, sabemos que cada grupo metilo (—CH2—) de una cadena hidrocarbonada lineal alarga la longitud de la cadena aproximadamente 0,13 nm. A partir de estudios sobre estructura de proteínas, sabemos además que una vuelta de una α-hélice incluye 3,6 residuos de aminoácidos y extiende el eje mayor de la hélice aproximadamente 0,56 nm. Utilice esta información para contestar a lo siguiente:

(a) ¿Cuánto mide una única molécula de ácido palmítico (16 átomos de carbono) en su forma completamente extendida? ¿Y una molécula de ácido laúrico (12C) y otra de ácido araquidónico (20)?

(b) ¿Cuánto es el espesor del interior hidrofóbico de una membrana típica comparado con la longitud de dos moléculas de ácido palmítico puestas extremo con extremo? ¿Y con respecto a dos moléculas de ácido laúrico o ácido araquidónico?

(c) ¿Cuántos aminoácidos debe tener aproximadamente un segmento transmembrana con forma de hélice de una proteína integral de membrana, si el segmento tiene que cruzar la bicapa lipídica definida por dos moléculas de ácido palmítico puestas extremo con extremo?

(d) La proteína bacteriorodopsina tiene 248 aminoácidos y siete segmentos transmembrana. Aproximadamente, ¿qué porción de los aminoácidos forman parte del segmento transmembrana? Asumiendo que la mayoría de los aminoácidos restantes están presentes en los bucles hidrofílicos que mantienen unidos los segmentos transmembrana, ¿cuántos aminoácidos, en promedio, están presentes en cada uno de esos bucles?

7.6 Temperatura y composición de la membrana. ¿Cuál de las siguientes respuestas probablemente *no* se observará cuando un cultivo bacteriano que crece a 37 °C se transfiera a una sala de cultivo que se mantiene a 25 °C? Explique su respuesta.

(a) Un descenso inicial de la fluidez de la membrana.

(b) Una sustitución gradual de los ácidos grasos de cadena corta por ácidos grasos más largos en los fosfolípidos de la membrana.

(c) Una sustitución gradual de ácido esteárico por ácido oleico en los fosfolípidos de la membrana.

(d) Una mejora de la velocidad de síntesis de los ácidos grasos insaturados.

(e) La incorporación de más colesterol en la membrana.

7.7 Fluidez de membrana y temperatura. A menudo se estudian los efectos de la temperatura y de la composición lipídica sobre la fluidez de la membrana, utilizando membranas artificiales que contienen solamente una o unas pocas clases de lípidos y ninguna proteína. Suponiendo que usted y su compañero de laboratorio han fabricado las siguientes membranas artificiales:

Membrana 1: Fabricada por entero a partir de fosfatidilcolina con ácidos grasos saturados de 16 carbonos.
Membrana 2: La misma que la membrana 1, excepto que cada uno de los ácidos grasos de 16 carbonos tiene un único doble enlace *cis*.
Membrana 3: La misma que la membrana 1, excepto que cada uno de los ácidos grasos saturados tiene sólo 14 átomos de carbono.

Después de determinar las temperaturas de transición de las muestras que representan a cada una de las membranas, descubre que su compañero de laboratorio se equivocó al apuntar a qué tipo de membranas correspondían las muestras. Los tres valores que determinó fueron −36 °C, 23 °C y 41 °C. Asigne cada una de estas temperaturas de transición a la membrana artificial correcta y explique su respuesta.

7.8 Popurrí de membrana. Explique cada una de las siguientes observaciones tan brevemente como sea posible

(a) Tanto la proteína A como la B tienen un peso molecular de 33.000 y constan de una única cadena polipeptídica con 240 aminoácidos hidrofílicos y 60 aminoácidos hidrofóbicos; la proteína A es una proteína integral de membrana y la proteína B es una proteína soluble.

(b) Cuando se realiza un experimento de fotoblanqueamiento, utilizando membranas plasmáticas de mioblastos (precursores de células musculares), similar al descrito en la Figura 7.11, con glicoproteínas de superficie marcadas con fluorescencia, se tarda mucho más en conseguir que la mancha oscura no fluorescente, adquiera fluorescencia otra vez, que cuando se marcan fosfolípidos con un colorante fluorescente. Además, sólo un 55% de la fluorescencia de las proteínas vuelve finalmente a la zona de la mancha blanqueada por el láser.

(c) En las patas de un reno, las membranas de las células que están más cerca de las pezuñas tienen una mayor proporción de ácidos grasos insaturados que las membranas de las células del resto de la pata.

(d) La mayoría de los agentes utilizados en medicina como anestésicos son apolares y actúan aumentando la fluidez de las bicapas lipídicas de las membranas celulares hasta el punto de que la transmisión del impulso nervioso se interrumpe y las sensaciones de dolor se eliminan.

7.9 Las bacterias pequeñas no pueden. *Acholeplasma laidlawii* es una bacteria pequeña que no puede sintetizar sus propios ácidos grasos y por tanto debe construir su membrana plasmática a partir de los ácidos grasos disponibles en su entorno. El resultado es que la membrana de Acholeplasma adquiere las características físicas de los ácidos grasos que estén disponibles en ese momento.

(a) Si a las células de Acholeplasma se les da acceso a una mezcla de ácidos grasos saturados e insaturados crecerán a temperatura ambiente. ¿Puede explicar por qué?

(b) Si transfiere una parte de las bacterias a un medio que contiene sólo ácidos grasos saturados y no realiza ningún otro cambio en las condiciones de cultivo, dejarán de crecer inmediatamente después de haber cambiado el medio. Explique por qué.

(c) ¿Cuál sería la única forma de que las bacterias del apartado b creciesen otra vez sin cambiarles el medio? Explique su respuesta

(d) Si Ud. tuviera que mantener el cultivo de Acholeplasma del apartado b en las condiciones que allí se describen, durante un periodo de tiempo prolongado, ¿qué se puede predecir sobre lo que les ocurriría a las bacterias? Explique su respuesta.

(e) ¿Qué resultados esperaría si transfiriese una parte de las bacterias a un medio que sólo contuviera ácidos grasos insaturados, sin realizar ningún otro cambio en las condiciones del cultivo? Explique su respuesta.

• 7.10 Hidropatía: esto se pone interesante. Una representación de hidropatía se utiliza para predecir la estructura de las proteínas de membrana basándose en su secuencia de aminoácidos y en los valores de hidrofobicidad de éstos. La hidrofobicidad se mide como un cambio en la energía libre estándar $\Delta G^{o\prime}$, en kilojulios/mol (kJ/mol), debido a la transferencia de un residuo de aminoácido, desde un solvente hidrofóbico hacia el agua. El índice de hidropatía, se calcula promediando los valores de hidrofobicidad de una serie de segmentos cortos del polipéptido, estando cada segmento desplazado, un aminoácido a partir del extremo N-terminal. El índice de hidropatía de cada segmento sucesivo, se representa en función de la localización de ese segmento en la secuencia de aminoácidos. La representación se examina buscando regiones de alto índice de hidropatía.

(a) ¿Por qué los científicos intentan predecir la estructura de una proteína de membrana por estos medios indirectos cuando la técnica de cristalografía de rayos X revelaría la estructura directamente.

(b) Sabiendo cómo se define, ¿cómo esperaría que fuera el índice de hidrofobicidad de un residuo hidrofóbico como valina o isoleucina, positivo o negativo? ¿Y de un residuo hidrofílico como ácido aspártico y arginina?

(c) Debajo hay una lista de cuatro aminoácidos y cuatro valores de hidrofobicidad. Relacione los índices de hidrofobicidad con los aminoácidos correctos y explique su respuesta.

Aminoácidos: alanina; arginina; isoleucina; serina

Hidrofobicidad (en kJ/mol): +3,1; +1,0; −1,1; −7,5

(d) En la Figura 7.30 se muestra una representación de hidropatía para una proteína integral de una membrana concreta. Dibuje una barra horizontal sobre cada segmento transmembrana identificado por la representación. ¿Qué longitud tiene, aproximadamente, el segmento transmembrana? Comparado con el número que Ud. calculó en el Problema 7.5c ¿El valor se ajusta? ¿Cuántos segmentos transmembrana, piensa Ud., que tiene la proteína? ¿Puede suponer de qué proteína se trata?

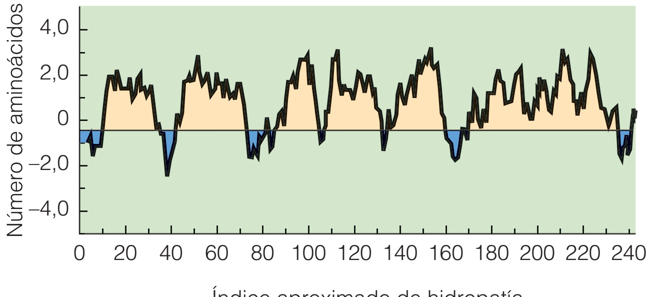


Figura 7.30 Representación de hidropatía para una proteína integral de membrana. *Véase* Problema 7.10d.

• 7.11 Dentro o fuera. Por la Figura 7.24 sabemos que las regiones expuestas de las proteínas de membrana se pueden marcar con ^{125}I mediante la reacción de la lactoperoxidasa (LP). De manera similar, las cadenas laterales de carbohidratos de las glicoproteínas de membrana se pueden marcar con ^{3}H mediante la oxidación de las galactosas con la galactosa oxidasa (GO), seguido de una reducción con borohidrido tritiado ($^{3}H\text{-}BH_4$). Sabiendo que tanto la LP como la GO son demasiado grandes como para penetrar en el interior de una célula intacta, explique cada una de las siguientes observaciones realizadas con eritrocitos intactos.

(a) Se incuban células intactas con LP en presencia de ^{125}I, se extraen las proteínas de membrana y se analizan en geles de poliacrilamida con SDS. Se detecta que varias de las bandas del gel son radiactivas.

(b) Se incuban células intactas con GO y luego se reducen con $^{3}H\text{-}BH_4$. Se detecta que varias de las bandas del gel son radiactivas.

(c) Todas las proteínas de la membrana plasmática que contienen carbohidratos se marcan con el método GO/$^{3}H\text{-}BH_4$

(d) Ninguna de las proteínas de la membrana plasmática del eritrocito desprovista de carbohidratos se marca con el método LP/^{125}I

(e) Si se rompe el eritrocito antes del procedimiento de marcaje, el método de la LP marca prácticamente todas las proteínas de la membrana.

• 7.12 El interior de la membrana en el exterior. Técnicamente es posible preparar vesículas selladas a partir de

membranas de eritrocitos en las que la orientación original de la membrana esté invertida. Tales vesículas tienen, lo que originalmente era el lado citoplásmico de la membrana, mirando hacia el exterior.

(a) ¿Qué resultados esperaría de estas vesículas, que contienen la parte interna de la membrana hacia el exterior, si fuesen sometidas al método GO/^{3}H-BH_4 descrito en el Problema 7.11?

(b) ¿Qué resultados esperaría de estas vesículas, que contienen la parte interna de la membrana hacia el exterior, si fuesen sometidas al método LP/^{125}I del Problema 7.11?

(c) ¿Qué conclusiones se extraerían si algunas de las proteínas que se marcan con el método LP/^{125}I del Apartado b estuviesen entre las que se habían marcado cuando se trataron células intactas con el mismo método, en el Problema 7.11a?

(d) Sabiendo que a partir de la membrana plasmática de los eritrocitos es posible preparar vesículas, que contienen la parte interna de la membrana hacia el exterior, piense en una manera de marcar una proteína transmembrana con ^{3}H en un lado de la membrana y con ^{125}I en el otro lado.

Bibliografía recomendada

Las referencias con importancia histórica están marcadas con •.

Referencias generales

Mathews, C. K., K. E. van Holde y K. G. Ahern. *Biochemistry,* 3rd ed. Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings, 2000.

Vance, D. E. y J. E.Vance, eds. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes.* New York: Elsevier Science, 1996. (Volume 31 in the series *New Comprehensive Biochemistry*).

Estructura y función de la membrana

•Branton, D. y R. Park. *Papers on Biological Membrane Structure.* Boston: Little, Brown, 1968.

Cossins, A. R. *Temperature Adaptations of Biological Membranes.* London: Portland Press, 1994.

•Davson, H. y J. F. Danielli, eds. *The Permeability of Natural Membranes.* Cambridge, England: Cambridge University Press, 1943.

•Gorter, E., and F. Grendel. On bimolecular layers of lipids on the chromocyte of the blood. *J. Exp.Med.* 41 (1925): 439.

Jacobson, K., E. D. Sheets y R. Simson. Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science* 268 (1995): 1441.

Packer, L., and S. Fleischer, eds. *Biomembranes.* San Diego: Academic Press, 1997.

•Robertson, J. D. The ultrastructure of cell membranes and their derivatives. *Biochem. Soc. Symp.* 16 (1959): 3.

•Rothstein, A. The cell membrane—a short historic perspective. *Curr. Topics Membr. Transport* 11 (1978): 1.

•Singer, S. J. y G. L. Nicolson. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175 (1972): 720.

•Stoeckenius,W. The purple membrane of salt-loving bacteria. *Sci. Amer.* 234 (June 1976): 38.

•Unwin, N. y R. Henderson. The structure of proteins in biological membranes. *Sci. Amer.* 250 (February 1984): 78.

Veenhoff, L. M., E. H. M. L. Heuberger y B. Poolman. Quaternary structure and function of transport proteins. *Trends Biochem. Sci.* 27 (2002): 242

Lípidos de membrana

Dowhan,W. Molecular basis for membrane phospholipid diversity: Why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem.* 66 (1997): 199.

Huang, C. H. Mixed-chain phospholipids: Structure and chain melting behavior. *Lipids* 36 (2001): 1077.

Katsaros, J. y T. Gutberlet, eds. *Lipid Bilayers: Structure and Interactions.* New York: Springer-Verlag, 2000.

Menon, A. Flippases. *Trends Cell Biol.* 5 (1995): 355.

Ohvo-Rekila, H., B. Ramstedt, P. Leppinmaki y J. P. Slotte. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog. Lipid Res.* 41 (2002): 66.

Stroud, R. M. The state of lipid rafts: From model membranes to cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32 (2003): 257.

Thompson, T. E. Lipids. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5 (1995): 529.

van Meer, G. The different hues of lipid rafts. *Science* 296 (2002): 855.

Zachowski, A. Phospholipids in animal eukaryotic membranes: Transverse asymmetry and movement. *Biochem. J.* 294 (1993): 1.

Proteínas de membrana

Abrahamson, J., I. Smirnova,V. Kasho, G.Verner, H. R. Kaback y S. Iwata. Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli. Science* 301 (2003): 610.

•Deisenhofer, J., O. Epp, K.Miki, R. Huber y H.Michel. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodopseudomonas viridis* at 3 Å resolution. *Nature* 318 (1985): 618.

•Frye, L. D., and M. Edidin. The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *J. Cell Sci.* 7 (1970): 319.

Huang, Y., M. J. Lemieux, J. Song, M. Auer y D.-N.Wang. Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli. Science* 301 (2003): 616.

Rees, D. C.*Membrane Proteins.* Boston: Academic Press, 2003.

Reits, E. A. J. y J. J. Neefjes. From fixed to FRAP:Measuring protein mobility and activity in living cells. *Nat. Cell Biol.* 3 (2001): E145.

Sussman, M. R. Molecular analysis of proteins in the plant plasma membrane. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45 (1994): 211.

von Heijne, G. Membrane proteins: From sequence to structure. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23 (1994): 167.

Werten, P. J. L., H.-W. Remigy, B. L. deGroot, D. Fotiadis, A. Philippsen,

H. Stahlberg, H. Grubmueller y A. Engel. Progress in the analysis of membrane protein structure and function. *FEBS Lett.* 529 (2002): 65.

White, S. H. *Membrane Proteins of Known Structure.* http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html. (2004; updated regularly).



8

Transporte a través de membrana: saltando la barrera de permeabilidad

En el Capítulo 7 se analizaron las propiedades estructurales y químicas de las membranas plasmáticas. Se destacó que su naturaleza hidrófoba las hace impermeables a la mayoría de moléculas y iones, manteniendo unas sustancias en el interior celular y otras en el exterior. Además, en las células eucariotas, las membranas de los orgánulos cumplen también este papel, manteniendo los iones y moléculas apropiados, para ejercer sus funciones específicas.

Sin embargo, las membranas son algo más que simples barreras de permeabilidad. De hecho, para el correcto funcionamiento de la célula y sus orgánulos, es esencial que determinadas moléculas y iones se intercambien selectivamente. En otras palabras, las membranas no son sólo barreras que restringen indiscriminadamente la entrada y salida de sustancias, sino que poseen una *permeabilidad selectiva*, que permite el intercambio controlado de moléculas y iones específicos. En este capítulo analizaremos los mecanismos que permiten el intercambio selectivo de sustancias y qué significa para la célula dicho transporte.

Las células y el proceso de transporte

Una característica esencial de cada célula o compartimiento intracelular, es su capacidad para acumular una variedad de sustancias en concentraciones, a menudo significativamente diferentes a las del medio que les rodea. Algunas de estas sustancias son macromoléculas, que entran y salen de la célula por mecanismos que serán analizados en otros capítulos. El Capítulo 12 incluye una discusión sobre la *endocitosis* y la *exocitosis*, procesos de transporte en masa que permiten el movimiento de sustancias encerradas en vesículas limitadas por membranas. La secreción de proteínas por las células y la importación proteica en los orgánulos serán analizadas en el Capítulo 22.

Por muy importantes que sean los procesos recién citados, la mayoría de las sustancias que atraviesan una membrana no son macromoléculas, sino iones y pequeñas moléculas orgánicas en disolución —en otras palabras, *solutos*—. Estos solutos atraviesan la membrana en fila de a uno, un ion o una molécula cada vez. Los iones más comúnmente transportados son el sodio (Na^+), el potasio (K^+), el calcio ($Ca2^+$), el cloruro (Cl^-) y el hidrógeno (H^+). La mayoría de las moléculas orgánicas de pequeño tamaño que son transportadas, son *metabolitos*-sustratos, productos intermedios y productos finales de rutas metabólicas, que se verifican en la célula o sus orgánulos. Los ejemplos más comunes son los de los azúcares, los aminoácidos y los nucleótidos. Estos solutos están casi siempre más concentrados en el interior de la célula u orgánulo, que en el exterior. Muy pocas reacciones o procesos celulares podrían verificarse a una tasa razonable, si las concentraciones a las que se encontraran los sustratos fueran las del exterior celular. En algunos casos, como en la señalización eléctrica de neuronas y células musculares, el movimiento regulado de iones a través de la membrana, es el elemento central.

Así pues, el **transporte**, la capacidad de mover selectivamente iones y moléculas orgánicas a través de una membrana, es un proceso básico en la función celular. La importancia del transporte queda demostrada por el hecho de que, aproximadamente el 20% de los genes identificados en la bacteria *Escherichia coli*, están implicados en dicho proceso. En la Figura 8.1 se resumen algunos de los fenómenos de transporte que tienen lugar en una célula eucariota.

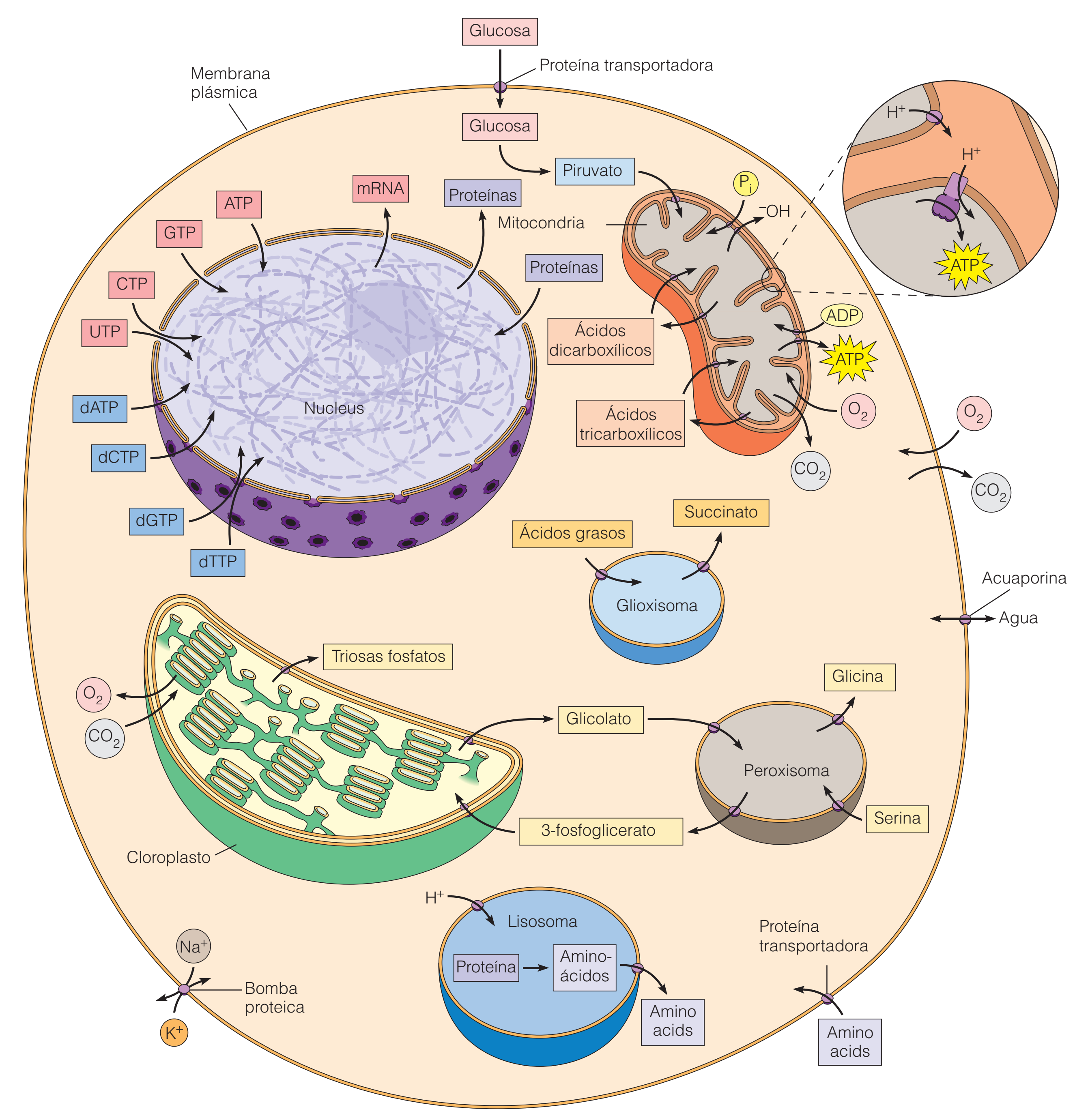


Figura 8.1 **Transporte en una célula eucariota ideal.** Las moléculas y iones mostrados en esta célula compuesta de elementos vegetales y animales, son algunos de los muchos solutos que se transportan a través de las membranas de las células eucariotas. Obsérvese que los nucleósidos trifosfatos precursores del DNA y el RNA entran en el núcleo a través de los poros nucleares. El detalle de la parte superior derecha muestra una pequeña parte de una mitocondria, donde se detalla el bombeo de protones hacia el exterior, que tiene lugar durante el transporte de electrones y cómo el potencial electroquímico resultante conduce a la síntesis de ATP.

Los solutos cruzan la membrana por difusión simple, difusión facilitada o transporte activo

El movimiento de solutos a través de una membrana se realiza mediante tres tipos de mecanismos. Algunas moléculas apolares pequeñas, como el oxígeno, el dióxido de carbono y el etanol, atraviesan la membrana por *difusión simple* —movimiento de solutos a través de la bicapa lipídica, en la dirección dictada por la diferencia de concentración del soluto entre ambos lados de la membrana—. Sin embargo, para la mayoría de los solutos, el movimiento a través de la membrana, con una tasa significativa, sólo es posible por la presencia de *proteínas transportadoras* —proteínas integrales de membrana, que reconocen sus-

tancias con una alta especificidad, acelerando su traslocación—. En algunos casos, las proteínas de transporte permiten la *difusión facilitada* de solutos, moviéndolos a favor del gradiente de energía libre (gradiente de concentración, de carga o ambos), en la dirección del equilibrio termodinámico. En otros casos, las proteínas transportadoras permiten el transporte activo de solutos en contra de su respectivo gradiente de energía libre, en un proceso endergónico acoplado a la hidrólisis de ATP o al transporte concomitante de otro soluto, generalmente un ion, como H^+ o Na^+, a favor de su gradiente de energía libre.

El movimiento de solutos a través de la membrana está determinado por su gradiente de concentraciones o su potencial electroquímico

Como se recordará del Capítulo 7, el movimiento de una molécula sin carga neta, viene determinado por el **gradiente de concentración** de dicha molécula a ambos lados de la membrana. La difusión facilitada de una molécula, implica su movimiento exergónico a favor del gradiente de concentración, mientras que el transporte activo implica el movimiento en contra de dicho gradiente y requiere aporte energético.

El movimiento de un ion, por otra parte, depende de su **potencial electroquímico**, que resulta de la integración de los gradientes de concentración y de carga, a ambos lados de la membrana. La difusión facilitada de un ion, implica el movimiento exergónico en la dirección dictada por su potencial electroquímico, mientras que el transporte activo se caracteriza por el movimiento de ese ion en contra de su potencial electroquímico. De hecho, es el transporte activo de iones quien genera el gradiente de cargas o **potencial de membrana** ($\mathbf{V_m}$), responsable de que un lado de la membrana tenga una carga neta negativa y el otro lado, positiva. V_m se expresa en voltios (V) o milivoltios (mV). La mayoría de las células tienen un exceso de solutos cargados negativamente en su interior, y por convención se dice que tiene un potencial de membrana negativo. Esta diferencia de carga favorece la entrada de cationes y la salida de aniones, a la vez que se opone a la salida de cationes y entrada de aniones.

En sentido estricto, a la hora de considerar el transporte iónico, debe usarse el término «potencial electroquímico» para designar el efecto combinado del gradiente de concentración y el potencial de membrana. Para muchos lectores, sin embargo, el término «gradiente electroquímico» es probablemente más fácil de entender. Usaremos ambos términos, pero preferentemente el de potencial electroquímico.

La membrana plasmática del eritrocito como ejemplo de los mecanismos de transporte

En nuestra discusión sobre los procedimientos de transporte, usaremos como ejemplo a las proteínas que mencionamos en el Capítulo 7. Éstas están entre las proteínas de transporte más estudiadas y, por tanto, entre las mejor comprendidas. Para asegurar la distribución de oxígeno a los tejidos desde de los eritrocitos, tienen que intercambiarse a través de la membrana, no sólo el O_2, sino también el CO_2 y el ion bicarbonato (HCO_3^-), así la glucosa, que sirve como fuente principal de energía. Es también importante el mantenimiento del potencial de membrana, gracias al transporte activo de iones potasio hacia el interior y iones sodio hacia el exterior. Por último, intervienen también unos *canales* o poros especiales, que permiten la entrada y salida rápidas de agua y iones, como respuesta a las necesidades de la célula. Estas actividades de transporte se resumen en la Figura 8.2 y se usarán como ejemplos en la siguiente exposición.

Difusión simple: movimiento no asistido a favor de gradiente

La forma más sencilla por la que un soluto puede pasar de un lado a otro de la membrana es la **difusión simple**, movimiento neto no asistido de un soluto desde una región

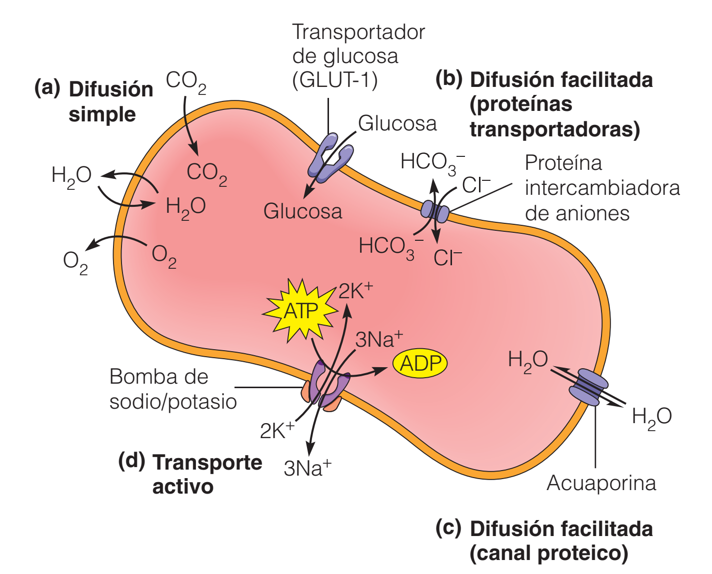


Figura 8.2 Principales procesos de transporte en el eritrocito. Se muestran varios de los tipos de transporte vitales para los eritrocitos. (**a**) *Difusión simple:* el oxígeno y el dióxido de carbono difunden a través de la membrana plasmática, como resultado de sus diferentes concentraciones fuera y dentro. (**b**) *Difusión facilitada mediada por proteínas transportadoras:* el movimiento de glucosa está facilitado por un transportador denominado GLUT1, que reconoce específicamente a la D-glucosa y a los isómeros D de unos pocos monosacáridos relacionados con ella. Una proteína intercambiadora de aniones facilita el transporte recíproco y en relación 1:1 de iones cloruro (Cl^-) y bicarbonato (HCO_3^-). (**c**) *Difusión facilitada mediada por canales proteicos:* las acuaporinas, canales proteicos de membrana, permiten la entrada y salida rápida de agua, si bien ésta puede atravesar también la membrana por difusión simple. (**d**) *Transporte activo:* acoplada a la hidrólisis de ATP, la bomba de Na^+/K^+ introduce tres iones sodio y expulsa dos iones potasio, estableciendo un potencial electroquímico de membrana, para ambos iones.

donde su concentración es mayor, a otra donde ésta es menor (Figura 8.2a). Dado que las membranas presentan una zona central hidrófoba, la difusión simple es un proceso relevante sólo para moléculas pequeñas y relativamente poco polares. Tales moléculas acceden a la bicapa lipídica por un lado, difunden pasivamente a través de ella y emergen por el otro lado, desde donde pasan, de nuevo, al medio acuoso.

El oxígeno es un modelo de molécula pequeña y no polar, que atraviesa fácilmente la bicapa lipídica hidrófoba, por difusión simple. Esta circunstancia permite que los erotrocitos del sistema circulatorio tomen oxígeno en los pulmones y lo liberen luego en los tejidos. En los capilares de los tejidos corporales, donde la concentración de oxígeno es baja, éste es liberado desde la hemoglobina y difunde pasivamente desde el citoplasma del eritrocito hacia el plasma sanguíneo y desde allí a las células que limitan los capilares (Figura 8.3a). En los capilares pulmonares se verifica el proceso contrario: el oxígeno difunde desde el aire inhalado en los pulmones, donde su concentración es mayor, al citoplasma de los eritrocitos, donde la concentración es menor (Figura 8.3b). El dióxido de carbono también atraviesa las membranas por difusión simple; sin embargo, la mayoría del CO_2 viaja en forma de ion bicarbonato (HCO_3^-), como veremos más tarde en este capítulo. No es de extrañar que el dióxido de carbono y el oxígeno atraviesen la membrana en sentido opuesto, difundiendo aquél desde los tejidos hacia los pulmones.

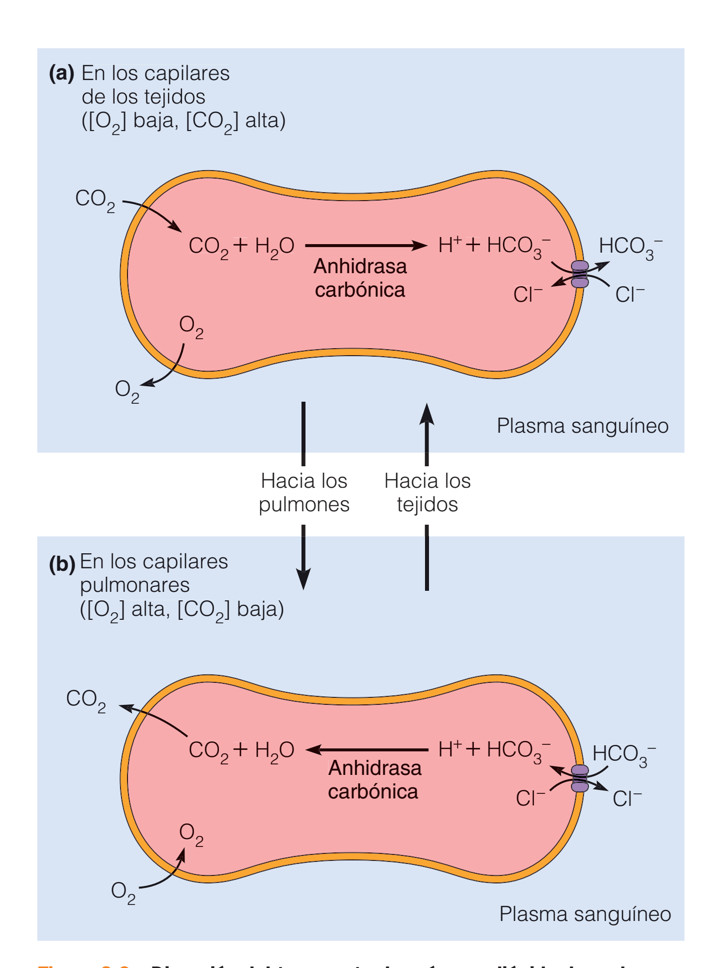
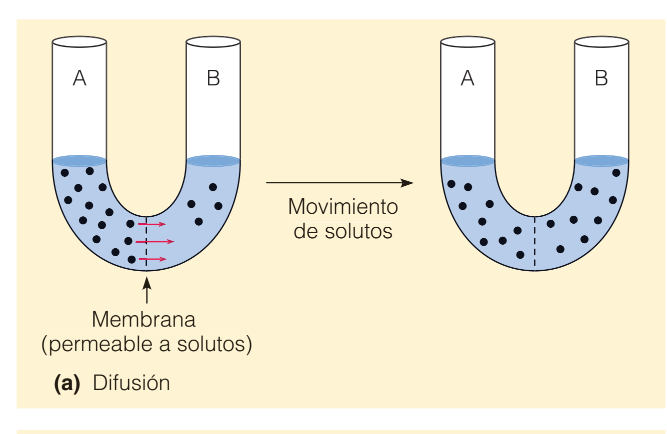


Figura 8.3 Dirección del transporte de oxígeno, dióxido de carbono y bicarbonato en los eritrocitos. Los sentidos en los cuales el O_2, el CO_2 y el HCO_3^- se mueven a través de la membrana plasmática en el eritrocito, dependen del lugar del cuerpo en el que se encuentre éste. (**a**) En los capilares de los tejidos, en los cuales la concentración de CO_2 es alta y la de O_2 baja, en relación a la concentración de dichos gases en el eritrocito, el O_2 se libera desde la hemoglobina alcanzando los tejidos. El CO_2 difunde hacia el eritrocito, donde se convierte en bicarbonato, gracias a la enzima citosólica anhidrasa carbónica. Los iones bicarbonato son expulsados por la proteína intercambiadora de aniones (la proteína banda-3 de la Figura 7-20b), a la vez que se introducen iones cloruro, manteniéndose el balance de cargas. Así, el dióxido de carbono retorna a los pulmones, en forma de bicarbonato y es transportado, tanto en el plasma sanguíneo, como en el citosol de los eritrocitos. (**b**) En los capilares del pulmón, donde la concentración de O_2 es alta y la de CO_2 baja, el O_2 difunde hacia los eritrocitos y se une a la hemoglobina. El bicarbonato entra desde el plasma sanguíneo, acompañado de la salida de cloruro, y se convierte en CO_2, que sale del eritrocito y de las células que forman la pared de los capilares del pulmón, siendo expelido al exterior.

La difusión mueve a los solutos hasta alcanzar el equilibrio

Con independencia de cómo se distribuya inicialmente una población de moléculas, la difusión tiende a crear una solución en la cual la concentración es la misma en todas partes. Este fenómeno queda bien ilustrado por medio del aparato mostrado en la Figura 8.4a, consistente en dos cámaras separadas por una membrana permeable a las moléculas del soluto no cargado S, representadas por puntos negros. Inicialmente la cámara A tiene una mayor concentración de S que la cámara B. Si el resto de las condiciones son las mismas, el movimiento aleatorio de moléculas a través de la membrana, en ambas direcciones, hará que se produzca un desplazamiento neto de S desde la cámara A hacia la cámara B. Cuando la concentración de S sea igual a ambos lados de la membrana, el sistema habrá alcanzado el equilibrio; el movimiento aleatorio de moléculas de un lado a otro continúa, pero no se producen cambios netos en la concentración. Así pues, *la difusión es siempre un movimiento que conduce al equilibrio.*

Otra forma de expresar esto es que la difusión siempre tiende a la reducción de la energía libre. Como aprendimos en el Capítulo 5, las reacciones químicas y los procesos físicos proceden siempre, de acuerdo con el segundo principio de la termodinámica, hacia la disminución de la energía libre. La difusión a través de las membranas no es una excepción: la energía libre se minimiza conforme las moléculas se mueven a favor de su gradiente de concentración y los iones fluyen siguiendo su gradiente electroquímico. Aplicaremos de nuevo este principio cuando calculemos la variación de energía libre, ΔG, debida al transporte de moléculas y iones a través de membranas. En la mayoría de los



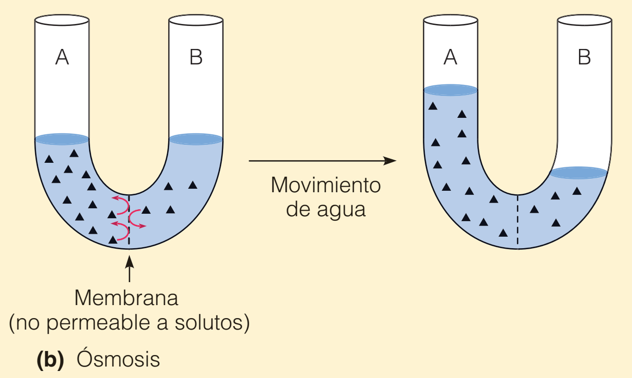


Figura 8.4 Comparación entre difusión simple y ósmosis. (**a**) La difusión simple tiene lugar cuando la membrana que separa las cámaras A y B es permeable a las moléculas de un soluto disuelto, representado por puntos negros. Las moléculas de soluto atraviesan la membrana en ambos sentidos, pero con un movimiento neto desde la cámara A a la B. El equilibrio se alcanza cuando la concentración del soluto es la misma en ambas cámaras. (**b**) Para entender los fenómenos osmóticos, supóngase que la membrana es impermeable al soluto disuelto, representado por triángulos negros. En este caso es el agua quien difunde desde la cámara en la que la concentración del soluto es menor, hacia la cámara en la que su concentración es mayor. En el equilibrio, la presión que se genera en la cámara con exceso de agua, contrarresta la tendencia del agua a seguir difundiendo hacia dicha cámara.

procesos de transporte en las membranas, el cambio en la energía libre depende sólo de los gradientes de concentración o electroquímico, pero también contribuyen otros factores, como el calor, la presión o la entropía, y en ciertos casos, es necesario tomarlos también en consideración. Por tanto, en términos estrictos, *la difusión progresa siempre desde regiones de mayor a menor energía libre.* En el equilibrio termodinámico, no existe movimiento neto, pues la energía libre del sistema es mínima.

Ósmosis es la difusión de agua a través de una membrana con permeabilidad selectiva

Ciertas propiedades del agua hacen que ésta se comporte de una manera peculiar. En primer lugar las moléculas de agua no están cargadas y, por tanto, no se ven afectadas por el potencial de membrana. Más aún, la concentración de agua a ambos lados de la membrana no presenta una diferencia apreciable. Entonces, ¿quién determina el sentido en el cual difunden las moléculas de agua? Cuando un soluto se disuelve en agua, las moléculas del soluto interrumpen la ordenada red de interacciones tridimensionales, que habitualmente tiene lugar entre las moléculas de agua, aumentando la entropía y disminuyendo la energía libre del sistema. El agua, como otras sustancias, tiende a difundir desde áreas de mayor energía libre a otras en las cuales es menor. Así pues, el agua tiende a moverse desde regiones de menor concentración de solutos (energía libre alta) a las de mayor concentración de solutos (energía libre baja).

Este principio se ilustra en la Figura 8.4b. Las cámaras A y B de la Figura 8.4a están ocupadas por disoluciones con diferente concentración de soluto y separadas por una membrana de permeabilidad selectiva, permeable al agua pero no al soluto en disolución. En estas condiciones, el agua se mueve o difunde a través de la membrana, desde la cámara A la cámara B. Tal movimiento de agua, en respuesta a diferencias de concentración de solutos, se llama **ósmosis**. El movimiento osmótico de agua a través de una membrana se produce siempre desde el lado de mayor energía libre (es decir, con la menor concentración de soluto) hacia el lado de menor energía libre (es decir, con la mayor concentración de soluto). Para la mayoría de las células, esto significa que el agua tenderá a moverse hacia el interior, pues la concentración de solutos es siempre mayor en el interior que en el exterior. Si no se controla, la entrada de agua puede causar el hinchamiento y posible ruptura de la célula. Para más detalles sobre el movimiento osmótico de agua y de cómo los organismos de diferentes reinos controlan el contenido y movimiento de agua, *véase* el Anexo 8A.

La difusión simple está limitada a moléculas pequeñas no polares

Para conocer los factores que influyen en la difusión de solutos a través de una membrana, los científicos usan a menudo modelos de membrana. Un importante avance en el desarrollo de tales modelos se debe a los trabajos de Alec Bangham y sus colaboradores, que en 1961 descubrieron que los lípidos extraídos de membranas celulares se dispersaban en el agua, formando liposomas, pequeñas vesículas de aproximadamente 0,1 μm de diámetro, constituidas por una bicapa lipídica, cerrada, esférica y carente de proteínas. Bangham demostró que mientras se forman los liposomas, es posible atrapar en ellos solutos como los iones potasio y posteriormente medir la tasa con la cual los solutos se escapan por difusión a través de la bicapa del liposoma.

Los resultados fueron muy importantes: los iones como el potasio y el sodio quedaban atrapados en las vesículas durante días, mientras que las moléculas pequeñas sin carga tales como el oxígeno, se intercambiaban tan rápida-

Ósmosis: un caso especial de difusión de agua

La mayoría de lo tratado en este capítulo se centra en el transporte de solutos —iones y pequeñas moléculas que están disueltas en el medio acuoso de las células, sus órganulos y el medio que los rodea—. Esto está plenamente justificado por el hecho de que la mayoría del tráfico a través de la membrana implica a iones, como K^+, Na^+ o H^+ y a moléculas hidrófilas, como azúcares, aminoácidos y varios metabolitos intermedios. Pero para comprender correctamente el mecanismo de transporte de solutos, necesitamos entender también las fuerzas que actúan sobre el agua y que determinan su movimiento dentro y fuera de las células. Así, aprenderemos que el agua, el disolvente universal en el mundo biológico, representa un caso especial en diferentes aspectos.

El movimiento de la mayoría de sustancias a través de una membrana puede expresarse en términos de gradiente de concentración y, en el caso de solutos cargados, de potencial de membrana. Sin embargo, esto no es válido para el agua; su concentración es esencialmente la misma a ambos lados de la membrana y como es una molécula sin carga, no se ve afectada por el potencial de membrana. Sin embargo, el agua atraviesa una membrana como respuesta a diferencias en la concentración de solutos. El agua tiende a difundir desde el lugar con menor concentración al de mayor concentración de soluto. Esta difusión del agua, denominada ósmosis, se observa fácilmente cuando una membrana de permeabilidad selectiva separa dos compartimientos, uno de los cuales contiene un soluto para el cual la membrana no es permeable (*véase* la Figura 8.4b).

El movimiento osmótico de entrada o salida de agua en una célula está relacionado con la **osmolaridad,** o concentración relativa de soluto en la solución en que se encuentra la propia célula. Las disoluciones con mayor concentración de soluto que el medio intracelular, se denominan *hipertónicas*, mientras que las de menor concentración, son las *hipotónicas*. Las soluciones hipertónicas hacen que las moléculas de agua difundan hacia el exterior de la célula, y las hipotónicas, que difundan hacia el interior. En otras palabras, el movimiento osmótico de agua se produce siempre desde la disolución hipotónica hacia la hipertónica. Las disoluciones en las que no se produce un desplazamiento neto de agua se denominan *isotónicas*.

La ósmosis es la responsable de un fenómeno bien conocido: las células tienden a contraerse o hincharse cuando la concentración del medio varía. Considérese, por ejemplo, el escenario de la Figura 8A.1. Una célula animal, inicialmente en una solución isotónica (una solución 0,25 *M* de sacarosa es prácticamente isotónica para la mayoría de las células), se retrae y deshidrata cuando es transferida a una solución hipertónica (Figura 8A.1a). Contrariamente, la célula se hinchará en una solución hipotónica y, de hecho, reventará (lisis celular) cuando la solución sea muy hipotónica, tal como el agua sin solutos (Figura 8A.1b).

Osmolaridad: un problema frecuente con diferentes soluciones

Los movimientos de agua mostrados en la Figura 8A.1, se producen por las diferentes osmolaridades entre el citoplasma y el medio extracelular. En la mayoría de las situaciones, la concentración de solutos es mayor en la célula que en el exterior. Esto se debe, en parte, a los elevados requerimientos de iones y moléculas orgánicas, para el normal funcionamiento del metabolismo y otras funciones celulares. Además, la mayoría de metabolitos y macromoléculas biológicas están cargados y los *contraiones* necesarios para equilibrar las cargas, inciden significativamente en la osmolaridad celular. Como consecuencia, la mayoría de las células son hipertónicas con relación al medio, lo cual significa que el agua tenderá a entrar a través de la membrana plasmática. Si esta tendencia no se controlara, las células se hincharían y posiblemente se lisarían.

La manera en que las células resuelven el problema de la alta osmolaridad y la consecuente entrada osmótica de agua, depende del reino al que el organismo pertenezca. Las células vegetales, algas, hongos y muchas bacterias están rodeadas por paredes celulares suficientemente gruesas y rígidas para evitar la hinchazón y ruptura en una solución hipotónica (Figura 8A.1d). Como consecuencia, las células —y los tejidos,

mente, que la tasa de transporte era difícilmente medible. La conclusión lógica fue que las bicapas lipídicas son la barrera primaria de permeabilidad de una membrana. Las moléculas pequeñas sin carga pueden atravesar la barrera por difusión simple, mientras que los iones sodio y potasio prácticamente no pasan. En base a experimentos posteriores de muchos investigadores, que utilizaron diferentes tipos de bicapas lipídicas y miles de solutos diferentes, podemos predecir, con considerable fiabilidad, cómo difunde un soluto a través de una bicapa lipídica. Como se indica en la Tabla 8.1, los tres factores que afectan sustancialmente a la difusión de solutos, son el tamaño, la polaridad y la carga —si el soluto es un ion—. Consideraremos a continuación cada uno de estos factores.

Tamaño del soluto. En términos generales, las bicapas lipídicas son más permeables a las moléculas pequeñas que a las grandes. Las moléculas pequeñas más relevantes para la función celular son el agua, el oxígeno y el dióxido de carbono. Las membranas son bastante permeables a estas moléculas; no se requieren mecanismos de transporte específicos para introducirlas o sacarlas de las células. Pero incluso estas moléculas tan pequeñas no atraviesan la membrana libremente. Las moléculas de agua, por ejemplo, difunden a través de una bicapa, ¡10.000 veces más despacio de lo que se mueven en ausencia de una membrana! La mejor manera de imaginar el movimiento pasivo de pequeñas moléculas a través de una membrana, es considerar que su difusión está limitada por la presencia de la bicapa lipídica, pero que ocasional-

en organismos pluricelulares como los vegetales— adquieren una gran firmeza debido a la presión generada por la entrada de agua. En el equilibrio la presión de turgencia del agua es proporcional a la concentración intracelular de solutos. En vegetales perfectamente hidratados, la turgencia resultante es la responsable de la firmeza celular o *turgor*.

Por el contrario, en una solución hipertónica, el movimiento de salida de agua facilita la separación entre la membrana y la pared celular, fenómeno denominado **plasmolisis** (Figura 8A.1c). La laxitud de un vegetal en condiciones de privación de agua es debida a la plasmolisis de sus células. La plasmolisis puede demostrarse fácilmente sumergiendo una rama de apio en una solución con un contenido alto de sal o azúcar. La plasmolisis puede llegar a ser un problema importante en plantas cultivadas en condiciones de salinidad alta, como ocurre algunas veces en lugares próximos al mar.

Las células animales y otras desprovistas de pared celular, resuelven sus problemas de osmolaridad bombeando hacia el exterior iones inorgánicos, de forma continua y activa, minimizando así la diferencia en la concentración de solutos entre la célula y el medio. Las células animales expulsan constantemente iones sodio; de hecho, esta es la principal función de la *bomba de* Na^+/K^+ (*véanse* Figuras 8.11 y 8.12). La importancia de esta bomba en la regulación del volumen celular se comprueba con el aumento de volumen, e incluso lisis celular, que tiene lugar cuando las células se tratan con *ouabaína*, un inhibidor de la bomba de Na^+/K^+. Así pues, las células sin paredes deben gastar significativamente más energía para asegurarse una osmolaridad relativamente baja, que impida su ruptura, mientras que las células con paredes toleran presiones osmóticas considerables sin riesgo de lisis.

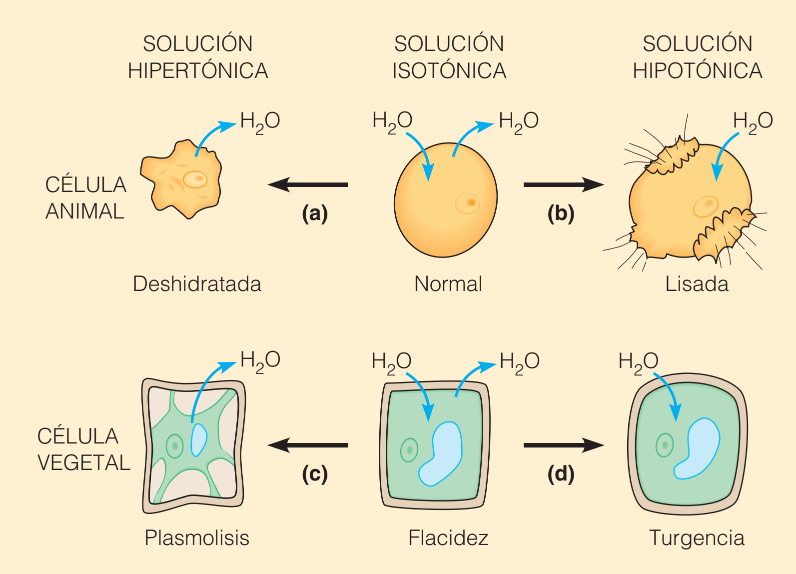


Figura 8A.1 Respuestas de las células animales y vegetales a los cambios de osmolaridad. (**a**) Si una célula animal (u otra célula no rodeada de pared) se transfiere desde una solución isotónica a otra hipertónica, el agua abandona la célula y ésta se encoge. (**b**) Si la célula se transfiere a una solución hipotónica, acepta agua, hinchándose, a veces hasta el extremo de reventar. (**c**) Las células vegetales (u otras células provistas de paredes rígidas) también se encojen (sufren plasmolisis) en una solución hipertónica, pero en una solución hipotónica (**d**) su turgencia simplemente aumenta, sin que revienten.

Tabla 8.1 Factores que regulan la tasa de difusión a través bicapas lipídicas

Factor	Ejemplos: Mayor permeabilidad	Ejemplos: Menor permeabilidad	Relación de permeabilidad*
1. Tamaño: la permeabilidad de la bicapa es tanto mayor cuanto menor sea la molécula	H_2O (agua)	$H_2N—CO—NH_2$ (urea)	10^2:1
2. Polaridad: la bicapa es más permeable a moléculas no polares	$CH_3—CH_2—CH_2—OH$ (propanol)	$HO—CH_2—CHOH—CH_2—OH$ (glicerol)	10^3:1
3. Carga: la bicapa es altamente impermeable a iones	O_2 (oxígeno)	OH^- (ion oxidrilo)	10^9:1

*Cociente de la tasa de difusión entre el soluto más permeable y el menos permeable.

mente atraviesan dicha bicapa y se difunden al azar hacia el otro lado, donde abandonan de nuevo la membrana.

La regla del tamaño sirve para moléculas de hasta aproximadamente unos cien daltons. El etanol (CH_3CH_2OH; 46 daltons) y el glicerol ($C_3H_8O_3$; 92 daltons) son capaces de difundir a través de membranas con una tasa de transporte razonable, pero no así la glucosa ($C_6H_{12}O_6$; 180 daltons). Las células precisan, por tanto, de proteínas insertadas en su membrana plasmática, que faciliten la entrada de glucosa y otros muchos solutos.

Polaridad del soluto. En general las bicapas lipídicas son relativamente permeables a moléculas no polares y menos permeables a las moléculas polares. Esto es debido a que las moléculas no polares se disuelven más fácilmente en la fase hidrófoba de la bicapa lipídica y así pueden atravesar la membrana mucho más rápidamente que las moléculas polares de tamaño similar. Como se recordará del Capítulo 7, la relación de Charles Overton, descubierta en 1895, entre la solubilidad en lípidos de varios solutos y su permeabilidad de membrana, fue una de las primeras indicaciones de la existencia en las membranas de una fase hidrófoba no polar.

La medición de la polaridad (o no polaridad) de un soluto es su *cociente de reparto*, que es la relación entre su solubilidad en un disolvente orgánico (como el octanol o un aceite vegetal) y su solubilidad en agua. En otras palabras, el equilibrio de distribución de un soluto, entre las fases acuosa y lipídica de una membrana, que determina cómo difundirá el soluto a través de dicha membrana. La Figura 8.5 ilustra la relación entre el cociente de reparto y la permeabilidad de membrana para una serie de solutos, utilizando aceite de oliva como disolvente orgánico y midiéndose la permeabilidad, como *penetrancia* en cm/seg (en la figura se expresa como *penetrancia relativa*). En general, cuanto más a polar o hidrófoba sea una sustancia, más rápidamente se mueve a través de una membrana. Nótese, por ejemplo, que un compuesto polar como la urea, con un bajo cociente de reparto, presenta también una permeabilidad relativamente baja. Sin embargo, puede disminuirse su polaridad añadiendo dos grupos metilo para formar dimetilurea, aumentando significativamente, tanto su cociente de reparto, como su permeabilidad, de hecho, ambos se incrementan aproximadamente en el mismo orden.

Permeabilidad a iones. La relativa impermeabilidad a las sustancias polares en general y a los iones en particular, es debida a su fuerte asociación con las moléculas de agua, que forman un *escudo de hidratación*. Para mover tales solutos en la membrana, se requiere que sean desnudados del agua, eliminando los enlaces entre los iones y las moléculas de ésta, en un proceso fuertemente endergónico. La rehidratación de los iones al otro lado de la membrana es, consecuentemente, un proceso exergónico. La asociación de los iones con las moléculas de agua para formar los escudos de hidratación es un fenómeno que restringe dramáticamente el transporte de iones a través de las membranas.

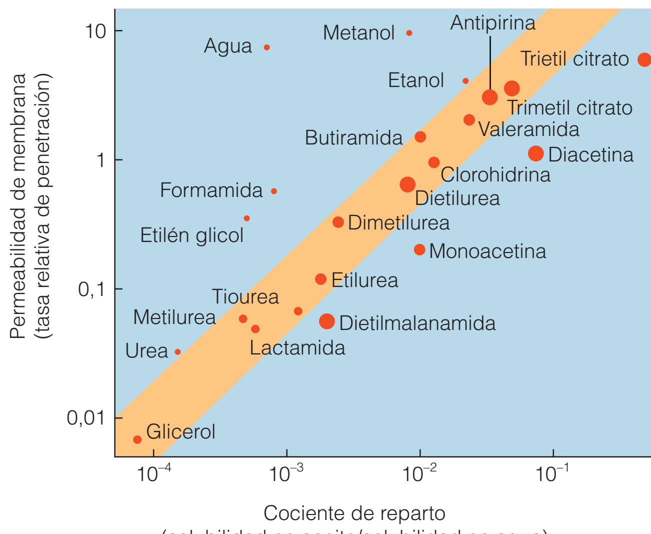


Figura 8.5 Relación entre la permeabilidad de membrana a un soluto y su cociente de reparto. La permeabilidad de cada soluto se expresa como su penetración relativa y se enfrenta a su cociente de reparto, basado en su solubilidad en lípido comparada a su solubilidad en aceite de oliva. En ambos ejes se emplea una escala logarítmica para dar cabida al amplio rango de valores (aproximadamente unas 10.000 veces). El diámetro de cada punto es proporcional al tamaño de la molécula que representa. Obsérvese que, a pesar de que hay una correlación general entre penetración y cociente de reparto, existen algunas desviaciones. Aquellas moléculas con una penetración más rápida que la esperada (es decir, aquellas cuyos puntos están por encima del área sombreada) son relativamente pequeñas, mientras que las de penetración más lenta que la esperada (aquellas cuyos puntos se encuentran por debajo del área sombreada), son relativamente grandes.

La impermeabilidad de las membranas a iones es muy importante para la actividad celular, puesto que todas las células deben mantener un potencial electroquímico de membrana para su correcto funcionamiento. En la mayoría de los casos se consigue con un gradiente de sodio (células animales) o de protones (casi todas las demás células). Análogamente, las mitocondrias y los cloroplastos dependen de gradientes de protones para poder funcionar. Por otra parte, las membranas deben dejar pasar iones de una forma controlada. Como veremos más adelante, las proteínas que facilitan el transporte de iones, sirven de canales hidrófobos de baja energía. Efectivamente, la interacción del ion con el interior relativamente hidrófilo del poro del canal, es en parte similar a la interacción con las moléculas de agua del ambiente acuoso existente a ambos lados de la membrana.

La tasa de difusión simple es directamente proporcional al gradiente de concentraciones

Hasta aquí, nos hemos centrado sólo en los aspectos cualitativos de la difusión simple. Podemos ahora incidir en términos cuantitativos, considerando las propiedades termodinámicas y cinéticas del proceso (Tabla 8.2). Termodi-

Tabla 8.2 Comparación entre difusión simple, difusión facilitada y transporte activo

Propiedades		Difusión simple	Difusión facilitada	Transporte activo
Solutos transportados	**Ejemplos**			
Pequeños no polares	Oxígeno	Sí	No	No
Grandes no polares	Ácidos grasos	No	Sí	No
Pequeños no polares	Agua, glicerol	Sí	Sí	No
Grandes polares	Glucosa	No	Sí	Sí
Iones	Na^+, K^+, Ca^{2+}	No	Sí	Sí
Propiedades termodinámicas				
Dirección con relación al gradiente electroquímico		A favor	A favor	En contra
Efecto sobre la entropía		Aumento	Aumento	Disminución
Requerimiento energético		No	No	Sí
Direccionalidad intrínseca		No	No	Sí
Propiedades cinéticas				
Mediado por proteínas de membrana		No	Sí	Sí
Cinética de saturación		No	Sí*	Sí
Inhibición competitiva		No	Sí	Sí

*La saturación de los canales proteicos tiene lugar a una concentración de soluto mucho mayor (concentración no fisiológica) que la de los transportadores.

námicamente, la difusión simple es siempre un proceso exergónico y, por tanto, no requiere energía. Las moléculas individuales difunden al azar en ambos sentidos, pero el flujo neto es siempre en la dirección de la menor energía libre —que en el caso de las moléculas no cargadas, significa a favor de gradiente de concentración—.

Desde el punto de vista cinético, una propiedad básica de la difusión simple, es que la tasa neta de transporte de una sustancia, es proporcional a la diferencia de concentraciones de dicha sustancia a través de la membrana. Para la difusión de un soluto *S* desde el exterior al interior de la célula, la expresión de la tasa, o velocidad de difusión de entrada a través de la membrana, $v_{entrada}$, es

$$v_{entrada} = P\Delta S \tag{8.1}$$

donde $v_{entrada}$ es la tasa de difusión de entrada (expresada en moles por segundo y cm^2 de superficie de membrana) y ΔS es el gradiente de concentraciones de soluto a través de la membrana ($\Delta S = [S]_{exterior} - [S]_{interior}$). *P* es el coeficiente de permeabilidad, parámetro determinado experimentalmente, que depende del grosor y la viscosidad de la membrana, del tamaño, la forma y la polaridad de S, así como de su distribución de equilibrio entre las fases acuosa y de membrana. Por definición, $v_{entrada}$ es en realidad, igual al flujo de entrada del soluto, puesto que el flujo es una medida la cantidad de soluto que se mueve por unidad de área y por unidad de tiempo*.

Como indica la Ecuación 8.1, la difusión simple se caracteriza por la relación lineal entre el flujo de entrada del solutos a través de la membrana y el gradiente de concentraciones del solutos, sin que se produzca una saturación aparente a concentraciones altas. Esta relación se observa como la línea roja de la Figura 8.6. A este respecto, la difu-

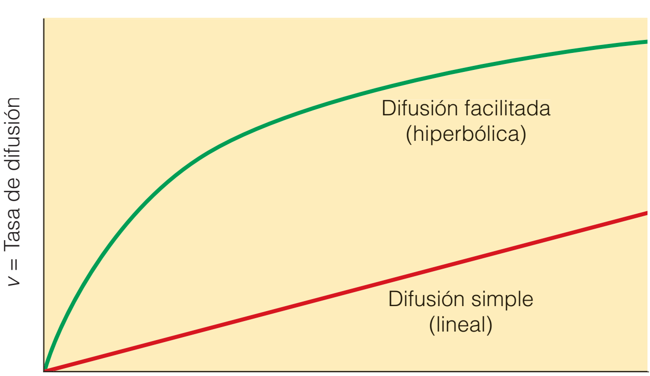


Figura 8.6 Comparación entre las cinéticas de difusión simple y difusión facilitada. En la difusión simple a través de membrana, la relación entre la tasa de difusión *v* y el gradiente de concentración del soluto ΔS es lineal, en un amplio rango de concentraciones (línea roja). En la difusión facilitada, la relación exhibe una cinética de saturación y es, consecuentemente, hiperbólica (línea verde). Para simplificar, se asume que la concentración inicial de soluto es [S] a un lado de la membrana y cero en el otro lado.

* La Ecuación 8.1 es una versión modificada de la ***primera ley de la difusión de Fick,*** que se expresa, usualmente, como $J = -D\Delta C/\Delta x$, donde J es la densidad de flujo (flujo por unidad de área), D es la constante difusión (expresada como cm^2/seg) y ΔC es la diferencia de concentración entre dos regiones separadas una distancia Δx (la diferencia de contracción a través de una membrana de grosor Δx, en el caso del transporte de membrana). El coeficiente de permeabilidad P se relaciona con D para la difusión de la sustancia S en la bicapa lipídica, mediante la expresión $P = KD/L$, donde L es el grosor de la membrana y K es el coeficiente de reparto para S; este último se define como la relación del equilibrio de concentraciones de S en aceite frente a agua.

sión simple se diferencia de la difusión facilitada, en que esta última es saturable, siguiendo, generalmente, la cinética de Michaelis-Menten, como veremos en breve. Por tanto, la difusión simple puede distinguirse de la difusión facilitada en sus propiedades cinéticas, como se mostraba en la Tabla 8.2.

Como resumen de la difusión simple, haremos notar que es solamente relevante para moléculas tales como en etanol y el O_2, que son lo suficientemente pequeñas y/o apolares para atravesar las membranas con una tasa razonable, sin que se precise la asistencia de proteínas transportadoras. La difusión simple progresa exergónicamente en el sentido dictado por el gradiente de concentraciones, con una relación lineal y no saturante, entre la tasa de difusión y el gradiente de concentraciones.

Difusión facilitada: movimiento a favor de gradiente, asistido por proteínas

La mayoría de las sustancias en las células son demasiado grandes o demasiado polares para atravesar las membranas por difusión simple con tasas de transporte razonables, pese a ser un proceso exergónico. Estos solutos entran y salen de las células y de los orgánulos de forma eficaz gracias a la asistencia de **proteínas transportadoras**, que intervienen en el movimiento de solutos a través de la membrana. Si el proceso es exergónico, se denomina difusión facilitada, pues el soluto difunde en el sentido impuesto por el gradiente de concentraciones (en moléculas sin carga) o el gradiente electroquímico (en iones). La función de las proteínas transportadoras es, simplemente, la de facilitar la difusión a favor de gradiente de sustancias polares o con carga, que de otra manera, no podrían pasar.

Como ejemplo de difusión facilitada, consideremos el paso de glucosa a través de la membrana plasmática de un eritrocito (o para el caso, de cualquier célula del organismo). La concentración de glucosa es mayor en la sangre que en el eritrocito, por lo que su entrada es exergónica —es decir, no requiere aporte energético—. Sin embargo, la glucosa es muy grande y muy polar para poder difundir sin asistencia a través de la membrana; se requiere una proteína de transporte para facilitar su movimiento de entrada (*véase* la Figura 8.2b).

Las proteínas transportadoras y los canales proteicos facilitan la difusión empleando mecanismos diferentes

Las proteínas de transporte que intervienen en la difusión facilitada de pequeñas moléculas y iones, son proteínas integrales de membrana que contienen algunos, o incluso muchos, segmentos transmembranales. Desde el punto de vista funcional, estas proteínas se clasifican en dos tipos principales, que transportan los solutos de formas diferentes. Los **transportadores proteicos** (denominados también *permeasas*) captan una o más moléculas de soluto en un lado de la membrana, sufriendo luego un cambio conformacional que permite la transferencia del soluto hacia el otro lado de la membrana. Se supone que el transportador rodea a las moléculas de soluto de tal forma, que aísla a los grupos polares o cargados del interior no polar de la membrana.

Los **canales proteicos**, por otra parte, constituyen *canales* hidrófilos que atraviesan la membrana y permiten el paso de solutos sin necesidad de grandes cambios conformacionales. Algunos de esos canales son relativamente grandes e inespecíficos, tales como los *poros*, propios de las membranas externas de las bacterias, mitocondrias y cloroplastos. Los poros están formados por proteínas transmembrana denominadas porinas, que permiten la difusión, a través de la membrana, de solutos hidrófilos con pesos moleculares de hasta 600 Da. Sin embargo, la mayoría de los canales son pequeños y muy selectivos. Casi todos estos intervienen en el transporte de iones, por lo que son descritos como *canales iónicos*. El movimiento de solutos a través de canales iónicos es mucho más rápido que el transporte por medio de transportadores proteicos, posiblemente porque no son necesarios cambios conformacionales complejos.

Las proteínas transportadoras alternan entre dos estados conformacionales

Uno de los motivos de interés en el estudio actual de las membranas es el concerniente a los mecanismos por los cuales las proteínas transportadoras facilitan el movimiento de solutos a través de membranas. Para las permeasas, la explicación más plausible es la de el **modelo de conformación alternativa** propuesto por S. Jonathan Singer y otros. De acuerdo con este modelo, un transportador es una proteína alostérica que alterna entre dos estados conformacionales, de forma que el lugar de unión del soluto está abierto o es accesible primero a un lado de la membrana y luego al otro. El soluto que se une a la proteína en un lado de la membrana, será liberado hacia el otro lado, cuando la proteína cambie a la conformación alternativa. Veremos en breve un ejemplo de este mecanismo, cuando discutamos la difusión limitada de glucosa en los eritrocitos.

Las proteínas transportadoras son análogas a las enzimas, por su especificidad y cinética

Como ya hemos señalado, las proteínas transportadoras son denominadas a menudo *permeasas*. El término es apropiado, porque el sufijo -asa sugiere una similitud entre estas proteínas y las enzimas. Como en las reacciones catalizadas por enzimas, la difusión facilitada implica la unión inicial del «sustrato» (el soluto a transportar) a un lugar específico de la superficie de la proteína (el lugar de unión al

soluto). Tras la formación de un complejo intermedio «encima-sustrato» (el soluto unido al transportador), se liberará el «producto» (el soluto transportado).

Especificidad de las Proteínas de Transporte. Otra propiedad que comparten las permeasas y las enzimas, es la *especificidad.* Al igual que las enzimas, las proteínas de transporte son muy específicas, a menudo para un solo compuesto o un pequeño grupo de compuestos íntimamente relacionados e incluso a veces, para un determinado estereoisómero. Un buen ejemplo es la permeasa que facilita la difusión de glucosa hacia el interior de los eritrocitos (*véase* Figura 8.2b). Esta proteína reconoce específicamente a la glucosa y a unos cuantos monosacáridos similares, como la galactosa y la manosa. Además, la permeasa es *estereoespecífica*: acepta a los isómeros D, pero no a los L de estos azúcares. Esta especificidad es posiblemente el resultado de un encaje muy preciso entre el soluto y el bolsillo de unión de la proteína transportadora.

Cinética de la función de las proteínas de transporte. Como cabe esperar por su analogía con las enzimas, las proteínas transportadoras se saturan conforme aumenta la concentración del soluto a transportar. Esto es debido a que el número de permeasas es limitado y cada una tiene una velocidad máxima de funcionamiento. Como resultado, el trasporte facilitado, al igual que la catálisis enzimática, exhibe una *cinética de saturación*, con una velocidad máxima V_{max} y una constante K_m correspondiente a la concentración de soluto necesaria para alcanzar la mitad de la tasa máxima de transporte (*véase* la Ecuación 6.7). Esto significa que la tasa inicial de transporte de soluto v se puede describir matemáticamente por una ecuación semejante a la usada para la cinética enzimática:

$$v = \frac{V_{max}\, S}{K_m + S} \qquad \textbf{(8.2)}$$

donde S es la concentración inicial de soluto a un lado de la membrana (por ejemplo. en el lado externo si se va a determinar la tasa de entrada). En la difusión facilitada, la representación del transporte frente a la concentración inicial de soluto es una hipérbole, en vez de la línea recta típica de la difusión simple (*véase* Figura 8.6, línea verde). Como ya hemos mencionado, esta diferencia permite distinguir entre la difusión simple y la facilitada (*véase* la Tabla 8.2).

Una última semejanza con las enzimas es que las proteínas transportadoras están, a menudo, sujetas a *inhibición competitiva,* por moléculas o iones relacionados estructuralmente con los «sustratos» canónicos. Por ejemplo, el transporte de glucosa por una proteína transportadora específica, se inhibe competitivamente por otros monosacáridos, que la proteína es también capaz de aceptar, o sea, la tasa de transporte de glucosa se reduce en presencia de otros azúcares transportables.

Las proteínas transportadoras movilizan uno o dos solutos

Aunque las proteínas transportadoras se parecen las unas a las otras en su cinética y mecanismos de acción, pueden diferir en otros aspectos. Una de esas diferencias es la que afecta al número de solutos transportados y al sentido en el cual se mueven. Cuando una permeasa transporta un solo soluto, el proceso se denomina **uniporte** (Figura 8.7a). La permeasa de glucosa de la Figura 8.8 es un ejemplo de uniporte. Cuando se transportan dos solutos simultáneamente y de manera acoplada, es decir, que no se produce el movimiento si uno de los solutos falta, se habla de **transporte acoplado** (Figura 8.7b). El transporte acoplado se considera **simporte** (o *cotransporte*) cuando los dos solutos se mueven en el mismo sentido; cuando atraviesan la membrana en sentidos opuestos, el proceso se denomina **antiporte**. Como veremos más adelante, estos términos se aplican con independencia de que el trasporte se verifique por difusión facilitada o por transporte activo; el término no hace referencia a la energética del proceso.

El transportador de glucosa del eritrocito y el intercambiador de aniones son ejemplos de proteínas transportadoras

Una vez descritas las propiedades generales de las permeasas, vamos a considerar brevemente dos ejemplos: el uniporte de glucosa y el antiporte de aniones.

El transportador de glucosa: un transportador de uniporte. Como ya hemos señalado, la entrada de glucosa en un eritrocito es un ejemplo de difusión facilitada, mediana por una permeasa de uniporte (Figura 8.2b). La concentración de glucosa en el plasma sanguíneo oscila, generalmente, en el rango de 65-90 mg/100 mL, o 3,6-5,0 m*M*. El eritrocito

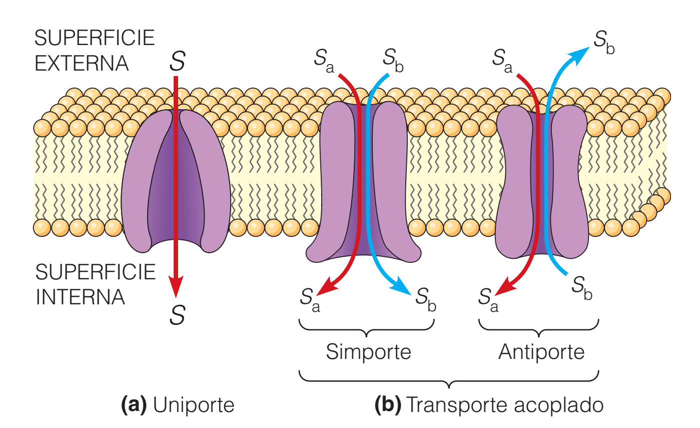


Figura 8.7 Comparación entre uniporte, simporte y antiporte. (**a**) En el uniporte, la proteína de transporte desplaza, a través de la membrana, a un único soluto. (**b**) El transporte acoplado implica el transporte concomitante de dos solutos, S_a y S_b. El transporte acoplado puede ser de tipo simporte (ambos solutos se mueven en el mismo sentido) o antiporte (los dos solutos se mueven en sentidos opuestos).

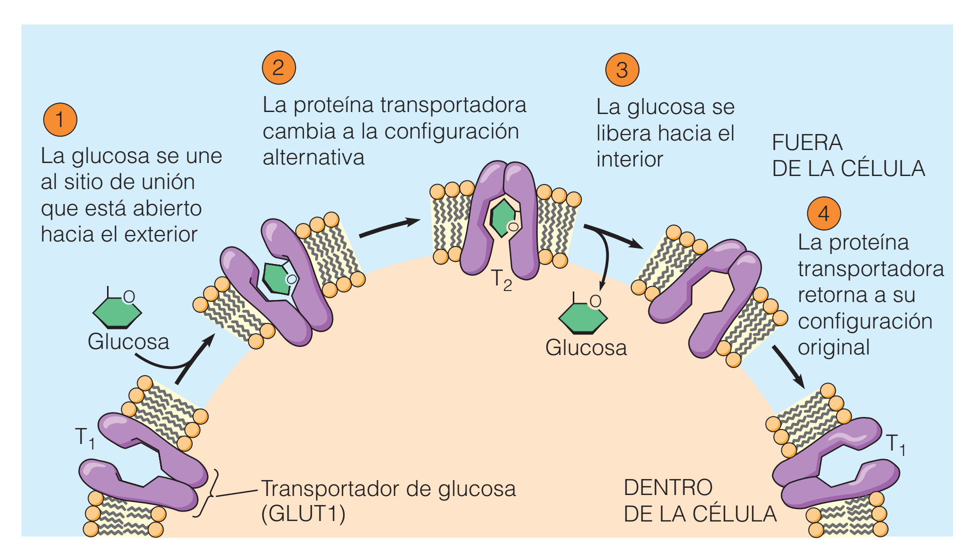


Figura 8.8 Modelo de conformación alternante para la difusión facilitada de glucosa, en el transportador de glucosa GLUT1. GLUT1, el transportador de glucosa presente en la membrana plasmática de los eritrocitos, es una proteína transmembrana que mueve las moléculas de glucosa a través de la membrana, alternando entre dos conformaciones, denominadas T_1 (con el lugar de unión abierto hacia el medio extracelular) y T_2 (con el lugar de unión abierto hacia el interior celular). El proceso de transporte es presentado aquí en cuatro fases, esquematizadas en el contorno de una célula. ① Cuando GLUT1 está en la conformación T_1, una molécula de D-glucosa puede chocar y unirse al lugar de unión de la proteína. ② Una vez unida la glucosa, el transportador pasa a la conformación T_2. ③ Esto permite la liberación de la glucosa hacia la célula, después de lo cual ④ GLUT1 vuelve a la conformación original T_1, dispuesta para un nuevo ciclo de transporte.

(en realidad cualquier célula en contacto con la sangre) es capaz de tomar glucosa por difusión facilitada, gracias a la concentración intracelular baja de este azúcar y a la presencia de una permeasa de glucosa en la membrana plasmática, el **transportador de glucosa** (GLUT). El GLUT de los eritrocitos se denomina GLUT1, para distinguirlo de otros GLUT característicos de otros tejidos de mamíferos. El GLUT1 facilita la entrada de glucosa con una velocidad que es unas 50.000 veces mayor que la permitida por la difusión simple a través de una bicapa lipídica.

La entrada de glucosa a través de GLUT1 muestra las características propias de la difusión facilitada: es específica para la glucosa (y unos cuantos azúcares relacionados, como la galactosa y la manosa), exhibe cinética de saturación y es susceptible de inhibición competitiva por monosacáridos similares. El GLUT1 es una proteína integral de membrana, con 12 segmentos transmembranales hidrófobos. Éstos, posiblemente se pliegan y ensamblan en la membrana para formar una cavidad limitada por cadenas laterales hidrófilas, que forman puentes de hidrógeno con las moléculas de glucosa, conforme éstas se desplazan a través de la membrana.

Se supone que GLUT1 transporta la glucosa por un mecanismo de alternancia de conformaciones, como se ilustra en la Figura 8.8. Los dos estados conformacionales se denominan T_1, con el lugar de unión de glucosa abierto hacia el exterior de la célula y T_2, que se abre hacia el interior celular. El proceso se inicia cuando una molécula de D-glucosa colisiona y se une a una molécula de GLUT1, que está en su conformación T_1 ①. Con la glucosa unida, GLUT1 cambia ahora a su conformación T_2 ②. El cambio conformacional permite la liberación de la molécula de glucosa hacia el interior de la célula ③, después de lo cual, la molécula de GLUT1 vuelve a su conformación inicial, es decir con el lugar de unión abierto de nuevo hacia el exterior ④.

El ejemplo que se muestra en la Figura 8.8 es el de la entrada de glucosa, pero el proceso es reversible, puesto que las permeasas funcionan en ambos sentidos. Las proteínas transportadoras son simplemente las puertas de un muro infranqueable y, como la mayoría de las puertas, permite el tráfico en ambos sentidos. Las moléculas de soluto pueden entrar o salir, dependiendo de su concentración relativa a ambos lados de la membrana. Si la concentración es mayor en el exterior, el flujo neto será de entrada; si por el contrario la concentración es mayor en el interior, el flujo será de salida.

El GLUT1 es tan sólo uno de los muchos transportadores de glucosa de los mamíferos. Cada uno de éstos está codificado por un gen independiente, con las características físicas y genéticas apropiadas para realizar su función en el tipo particular de tejido en el que se encuentran. Por ejemplo, el GLUT2, el transportador de glucosa del hígado, tiene una cinética propia, que se adapta al papel de exportación de glucosa, cuando el glucógeno hepático es hidrolizado para recuperar los niveles de glucosa en la sangre.

La concentración intracelular baja de glucosa que permite la difusión de entrada en la mayoría de las células animales, es debida al que la glucosa, nada más entrar, se fosforila rápidamente a glucosa-6-fosfato, por la enzima

hexoquinasa, consumiendo ATP como fuente de fosfato y energía:

$$\text{glucosa} \xrightarrow[\text{hexoquinasa}]{\text{ATP} \quad \text{ADP}} \text{glucosa-6-fosfato} \qquad \textbf{(8.3)}$$

La acción de la hexoquinasa es el primer paso del metabolismo de la glucosa, que discutiremos en el Capítulo 9. La baja K_m de la hexoquinasa por la glucosa (1,5 m*M*) y la naturaleza exergónica de la reacción ($\Delta G°' = -4{,}0$ kcal/mol), aseguran que la concentración de glucosa en el interior en la célula se mantiene baja. En muchas células de mamíferos, la concentración intracelular de glucosa oscila entre 0,5 y 1,0 m*M*, aproximadamente de un 15 a un 20% de los niveles en el plasma sanguíneo.

La fosforilación de la glucosa tiene además el efecto de encerrarla en la célula, ya que la membrana del eritrocito no tiene un transportador para la glucosa-6-fosfato. (GLUT1, como la mayoría de los transportadores de azúcares, no reconoce a las formas fosforiladas). Ésta es, de hecho, una estrategia generalizada para la retención de moléculas dentro de la célula, porque la mayoría de éstas carecen de proteínas de membrana capaces de transportar compuestos fosforilados.

El intercambiador de aniones del eritrocito: un transportador de antiporte. Otro ejemplo bien estudiado de difusión facilitada es el del transporte de iones cloruro y bicarbonato por la **proteína intercambiadora de aniones** de la membrana plasmática del eritrocito (*véase* la Figura 8.2b). Esta proteína de antiporte, también llamada *intercambiador de cloruro-bicarbonato* (o *banda 3*; *véase* la Figura 7.20b) permite el intercambio recíproco de iones cloruro (Cl^-) y bicarbonato (HCO_3^-) a través de la membrana. Para que funcione el intercambiador, es preciso que se produzca el transporte acoplado de cloruro y bicarbonato. El intercambio de aniones es, además, muy selectivo; la relación es 1:1 y no se aceptan otros aniones.

Al igual que el transportador de glucosa, el intercambiador de aniones alterna entre dos estados conformacionales, si bien aquí se precisa la unión simultánea de dos solutos, uno a cada lado de la membrana. Cada anión puede unirse a la proteína en cualquiera de los dos lados de la membrana, pero la unión y el transporte hacia el interior de uno de los iones, sólo se produce cuando hay suficiente cantidad del otro ion, para que este último sea trasladado hacia el exterior. En las células con una concentración de bicarbonato alta, el ion tiende a unirse a la superficie interna del intercambiador, siendo intercambiado por los iones cloruro del exterior celular. En las células en las que la concentración de bicarbonato es baja, se verifica el proceso inverso: el bicarbonato se une por la parte externa de la proteína y se intercambia con los iones cloruro del interior celular.

El movimiento bidireccional rápido del bicarbonato a través de la membrana plasmática, gracias a los intercambiadores de aniones, desempeña un papel esencial en el proceso de la expulsión del CO_2 en los pulmones, resultante del metabolismo celular (*véase* Figura 8.3). En su forma gaseosa, el CO_2 es poco soluble en soluciones acuosas, como el citosol o el plasma sanguíneo. El CO_2 difunde desde los tejidos hacia los eritrocitos, donde la enzima citosólica *anhidrasa carbónica* lo transforma en iones bicarbonato. Conforme aumenta la concentración de bicarbonato, éste va siendo expulsado de los eritrocitos. Para prevenir un imbalance de cargas, la salida de cada ion negativo bicarbonato se acopla a la entrada de un ion negativo cloruro. En los pulmones, el proceso se revierte: los iones cloruro salen de los eritrocitos, a la vez que entran los de bicarbonato, que se convierten en CO_2, gracias a la anhidrasa carbónica. El resultado neto es el movimiento de CO_2 (en forma de iones bicarbonato) desde los tejidos a los pulmones, desde donde es expulsado del cuerpo, durante la espiración.

Los canales proteicos facilitan la difusión, formando túneles hidrófilos en la membrana

Mientras que algunas proteínas transportadoras facilitan la difusión actuando como lanzaderas que alternan entre diferentes estados conformacionales, otras forman *canales transmembranales*, que permiten a los solutos —principalmente iones— desplazarse directamente a través de la membrana. Consideraremos tres tipos de canales proteicos transmembranales: canales iónicos, porinas, y acuaporinas.

Canales iónicos: proteínas transmembrana que permiten el paso rápido de determinados iones. Pese a su aparentemente simple diseño —un pequeño poro limitado por aminoácidos de cadena lateral hidrófila— los **canales iónicos** son muy selectivos. La mayoría permiten el paso de una sola especie iónica, de forma que son necesarios canales diferentes para el transporte de iones, tales como Na^+, K^+, Ca^{2+} y Cl^-. Esta selectividad es destacable, si tenemos en cuenta las escasas diferencias en tamaño y carga que presentan estos iones. El mecanismo subyacente no es del todo conocido; una hipótesis razonable es que la selectividad puede basarse, tanto en la existencia de lugares específicos de unión de los iones, como en la presencia de un estrechamiento del canal, que sirve como un filtro. También es de reseñar la tasa de transporte: ¡en algunos casos, un único canal puede ser atravesado por casi un millón de iones por segundo!

La mayoría de los canales iónicos están *regulados*, lo que significa que el poro se abre y cierra en respuesta a determinados estímulos. En las células animales existen tres tipos de estímulos que controlan la apertura y cierre de los canales regulados: *canales operados por voltaje*, que se abren y cierran como respuesta a cambios en el potencial de

membrana; *canales operados por ligando*, regulados por la unión al canal de determinadas sustancias y *canales mecanosensibles*, que responden a fuerzas mecánicas que actúan en la membrana.

La regulación del movimiento iónico a través de membranas es esencial en muchos tipos de comunicación celular. Por ejemplo, la transmisión de señales eléctricas por las células nerviosas depende de movimientos rápidos y controlados de iones Na^+ y K^+ a través de sus respectivos canales. Estos cambios son tan rápidos, que se miden en milisegundos. Además de esta regulación inmediata, la mayoría de los canales están también sometidos a regulaciones prolongadas en el tiempo, generalmente como respuesta a estímulos externos, como, por ejemplo, los estímulos hormonales.

Porinas: proteínas transmembranales que permiten el paso rápido de diversos solutos. Comparados con los canales iónicos, los poros de las membranas externas de las mitocondrias, cloroplastos y muchas bacterias, son bastante más grandes y mucho menos específicos. Estos poros se forman por proteínas denominadas **porinas**, que atraviesan varias veces la membrana. Las porinas bacterianas están entre las proteínas transmembrana cuya estructura ha sido determinada por cristalografía de rayos-X. Una característica esencial revelada por esta técnica es que los segmentos transmembranales de las porinas, no son hélices α, sino cilindros cerrados de láminas β, denominados barriles β. Los barriles β tienen en su centro un poro lleno de agua. El interior del poro está limitado por cadenas laterales polares, mientras que en la parte externa del barril las cadenas laterales son en su mayoría no polares e interaccionan con el interior hidrófobo de la membrana. El poro permite el paso de varios solutos hidrófilos, cuyo paso queda únicamente restringido por el tamaño del poro de la porina en particular.

Acuaporinas: proteínas transmembrana que permiten el paso rápido de agua. El agua atraviesa las membranas naturales y artificiales con una tasa mucho mayor de la que podría esperarse de una molécula polar. No se conoce bien la razón de este comportamiento. Una posibilidad sería que las membranas contuvieran poros que permitieran el paso de moléculas de agua y que a la vez fueran lo suficientemente pequeños para impedir el intercambio de otras sustancias polares. Una alternativa sugerente es que en el continuo movimiento de los lípidos de la membrana, pudieran crearse «agujeros» transitorios que permitieran el paso de agua, primero a través de una monocapa y después a través de la otra. Existen pocas evidencias experimentales que apoyen una u otra hipótesis, siendo un enigma cómo se mueve el agua a través de la mayoría de las membranas.

Sin embargo, en las células de algunos tejidos, existe un movimiento específico de agua, mediado por una familia de canales proteicos, denominados **acuaporinas (AQPs).** Las acuaporinas no son las responsables del intercambio de todo el agua que pasa a través de cualquier membrana (*véase* Figura 8.2a y c). Más bien facilitan la entrada y salida rápida de moléculas de agua en tejidos que así lo requieren. Por ejemplo los túbulos proximales del riñón reabsorben agua durante la formación de la orina; las células en este tejido tienen una elevada densidad de AQPs en sus membranas plasmáticas. Lo mismo ocurre en los eritrocitos, que deben ser capaces de expandirse o retraerse rápidamente, en respuesta a los cambios repentinos de presión osmótica, que tienen lugar cuando se desplazan por las arterias renales o de otros órganos (*véase* la acuaporina de la Figura 8.2c). En los vegetales, las AQPs son elementos destacados en la membrana de las vacuolas, como reflejo de los requerimientos de transporte rápido de agua que regulan la turgencia, como ya se discutió en el Anexo 8A. Las acuaporinas pueden ser también responsables del intercambio rápido de agua en otros tipos celulares, pero los citados son los ejemplos que mejor se conocen. Es interesante destacar que los procariotas parecen carecer de acuaporinas, posiblemente por su pequeño tamaño, ya que su gran relación superficie/volumen convierte en innecesario al transporte facilitado de agua.

Todas las acuaporinas descritas hasta la fecha son proteínas integrales de membrana con seis segmentos transmembranales de naturaleza helicoidal. En el caso de la AQP-1, la acuaporina propia de los túbulos proximales del riñón, la unidad funcional es un tetrámero formado por cuatro monómeros idénticos. Parece ser que los monómeros se asocian lateralmente en la membrana, con los 24 segmentos transmembranales orientados de manera que forman un canal central, limitado por cadenas laterales hidrófilas. El diámetro del canal es de unos 0,3 nm, el tamaño justo para permitir el paso de una molécula de agua cada vez. Aunque de diámetro tan restringido, el agua atraviesa el canal tetramérico de AQP-1 con una tasa de varios miles de millones de moléculas por segundo.

Transporte activo: movimiento en contra de gradiente, asistido por proteínas

La difusión facilitada es un mecanismo que permite acelerar el intercambio de sustancias a través de las membranas celulares, pero sólo hasta que las moléculas alcanzan el equilibrio, es decir, a favor de los gradientes de concentraciones o electroquímico. ¿Qué ocurre cuando una sustancia tiene que ser transportada en contra de gradiente? En tales situaciones, se requiere el **transporte activo**, un proceso que se diferencia de la difusión facilitada en un aspecto crucial: el transporte activo hace posible el movimiento de solutos en contra del equilibrio termodinámico (es decir, contra un gradiente de concentración o contra el potencial electroquímico), por lo que se requiere siempre el

aporte de energía. En otras palabras, el transporte activo acopla un proceso termodinámicamente desfavorable (es decir, endergónico) a otro exergónico. Así pues, las proteínas de membrana implicadas en el transporte activo, deben proporcionar mecanismos, no sólo para mover las moléculas de soluto deseadas a través de la membrana, sino también para acoplar tales movimientos a reacciones que cedan energía.

El transporte activo realiza tres funciones principales en las células y sus orgánulos. Primero, hace posible la toma de sustancias nutritivas esenciales del medio circundante, incluso cuando sus concentraciones son mucho menores que dentro de la célula. Segundo, permite que sean eliminadas varias sustancias, como productos de secreción y de desecho, incluso cuando la concentración en el exterior es mayor que en el interior. Tercero, permite que la célula mantenga constantemente, un desequilibrio en las concentraciones de ciertos iones inorgánicos, principalmente K^+, Na^+, Ca^{2+} y H^+.

Esta capacidad de crear un ambiente celular cuyas concentraciones de soluto se alejan del equilibrio, es un rasgo crucial del transporte activo. En contraste con la difusión simple o facilitada, que tiende a igualar las condiciones a un lado y otro de la membrana, el transporte activo tiene como consecuencia el establecimiento de diferencias en la concentración de soluto y/o el potencial eléctrico, a ambos lados de las membranas. El resultado final es un desequilibrio en estado estacionario, sin el cual la vida, tal y como la conocemos, sería imposible.

A menudo, las proteínas de membrana implicadas en el transporte activo, se denominan *bombas*, tanto en la literatura científica como en los libros de texto. Pese a todo, no hay ninguna analogía funcional con las bombas mecánicas. Al contrario, las bombas mecánicas transfieren fluidos de un lugar a otro, mientras que las bombas de la membrana, transportan selectivamente ciertos componentes —moléculas o iones— desde un fluido a otro.

Una diferencia importante entre el transporte activo y la difusión, sea simple o facilitada, concierne a la dirección del transporte. La difusión simple y la facilitada son no direccionales, en relación a la membrana; el soluto se puede mover en uno u otro sentido, dependiendo de los gradientes electroquímico y de concentración. El transporte activo, por otra parte, suele tener una **direccionalidad** intrínseca. Un sistema de transporte activo, que mueve un soluto en un sentido, por lo general no transportará dicho soluto activamente en el otro sentido. Se dice, por tanto, que el transporte activo es un proceso *unidireccional* o *vectorial*.

Algunos procesos de transporte activo son, en realidad, reversibles, pero en estos casos, el movimiento a favor de gradiente, o exergónico, se emplea para la formación de ATP u otros compuestos de alta energía, que servirán para impulsar el transporte en el otro sentido. Por ejemplo, una ATPasa que transporta protones activamente en un sentido, para crear un potencial electroquímico de protones a través de una membrana, puede ser invertido fisiológicamente, funcionando como un ATP sintasa, que utiliza la energía proporcionada por el potencial electroquímico. Análogamente, la mayor parte de los sistemas de antiporte y de simporte, pueden trabajar en sentido inverso.

El acoplamiento del transporte activo a una fuente de energía, puede ser directo o indirecto

Los mecanismos activos de transporte pueden dividirse en varias categorías, que se diferencian, principalmente, por la fuente de energía y por el número de solutos transportados. Atendiendo a la energética del transporte, éste puede ser directo o indirecto (Figura 8.9). En el **transporte activo directo**, la acumulación de moléculas de soluto o de iones a un lado de la membrana, se acopla directamente a una reacción química exergónica, comúnmente la hidrólisis de ATP (Figura 8.9a). Las proteínas de transporte que utilizan la energía liberada por la hidrólisis de ATP, se llaman *ATPasas de transporte* o *bombas ATPásicas*.

El **transporte activo indirecto** depende del intercambio simultáneo de dos solutos, uno de ellos a favor de gradiente, permitiendo que el otro lo haga en contra. El transporte puede ser un simporte o un antiporte, según los dos solutos se mueven en el mismo sentido o en sentidos con-

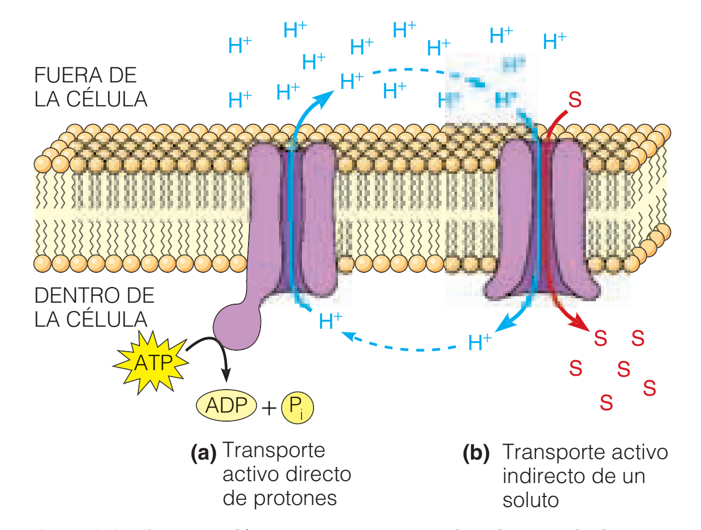


Figura 8.9 Comparación entre transporte activo directo e indirecto. (**a**) El transporte activo directo implica la existencia de un sistema de transporte acoplado a una reacción química exergónica, generalmente la hidrólisis de ATP. Como se muestra aquí, el ATP es responsable de la expulsión de protones, que genera un potencial electroquímico de protones en la membrana. (**b**) El transporte activo indirecto implica la existencia de un sistema de transporte acoplado al transporte de iones, protones en este caso. El movimiento exergónico de entrada de protones provee de energía para mover al soluto *S* a transportar, en contra de su gradiente de concentración o potencial electroquímico. Nótese la circulación de protones a través de la membrana, que resulta del acoplamiento en estos mecanismos de transporte activo, directo e indirecto.

trarios. En la mayor parte de los casos, uno de los dos solutos es un ion (por lo general Na^+ o H^+) que se mueve exergónicamente a favor de su gradiente electroquímico, facilitando el transporte concomitante del segundo soluto (por ejemplo, un monosacárido o un aminoácido) en contra de su gradiente de concentración o, en el caso de iones, contra su potencial electroquímico (Figura 8.9b).

Consideraremos primero el transporte activo directo y luego discutiremos el transporte activo indirecto.

El transporte activo directo se realiza mediante cuatro tipos de ATPasas

El mecanismo más común de transporte activo directo es el debido a ATPasas de transporte, que acoplan el transporte a la hidrólisis del ATP. Se han identificado cuatro tipos principales de ATPasas de transporte, conocidas como *tipo P*, *tipo V*, *tipo F*, y *tipo ABC* (Tabla 8.3). Se diferencian en la estructura, el mecanismo, la localización y papeles fisiológicos, pero todas ellas usan la energía de la hidrólisis del ATP, para transportar solutos contra un gradiente de concentración o un potencial electroquímico.

ATPasas de tipo P. Las ATPasas de tipo P (P de «phosphorylation») se fosforilan reversiblemente por ATP, en residuos de aspartato, durante el transporte. Entre las propiedades que comparten estas ATPasas, están las siguientes: están formadas por un único péptido con 8 a 10 segmentos, que zigzaguean atravesando varias veces la membrana; todos ellos son transportadores de cationes y, por último, son sensibles a la inhibición por el ion vanadato, VO_4^{3-}, circunstancia que se utiliza como criterio para distinguir a las ATPasas de tipo P. La mayor parte de las bombas de tipo P se localizan en la membrana celular, donde son las responsables del mantenimiento del gradiente iónico a ambos lados de la membrana plasmática. La más conocida es la bomba de Na^+/K^+, que se encuentra en casi todas las células animales. En breve consideraremos esta ATPasa más detalladamente (*véase* Figura 8.11). Otros ejemplos son la ATPasa responsable de la acidificación del jugo gástrico del estómago, la ATPasa que expulsa protones a través de la membrana celular de la mayor parte de las células vegetales, y la ATPasa que impulsa iones calcio desde el medio extracelular o los introduce en el retículo endoplásmico, en contra de su poten-

Tabla 8.3 Principales tipos de ATPasas de transporte (bombas)

Solutos transportados	Tipo de membrana	Tipo de organismo	Función de la ATPasa
ATPasas de tipo P (P de «phosphorylation»)			
Na^+ y K^+	Membrana plástica	Animales	Mantienen bala la $[NA^+]$ y alta la $[K^+]$ en la célula; mantienen el potencial de membrana
H^+	Membrana plástica	Vegetales, hongos	Bombean protones hacia el exterior celular; generan potential de membrana
Ca^{2+}	Membrana plástica	Eucariotas	Bombean Ca^{2+} hacia el exterior celular; mantienen baja la $[Ca^{2+}]$ en el citosol
Ca^{2+}	Retículo sarcoplásmico (RS; RE especializado)	Animales	Bombean Ca^{2+} hacia el RS; mantienen baja la $[Ca^{2+}]$ en el citosol
ATPasas de tipo V (V de «vacuola»)			
H^+	Lisososmas, vesículas de secreción	Animales	Mantienen bajo el pH del orgánulo, activando a las enzimas
H^+	Vacuolar membrane	Vegetales, hongos	Mantienen bajo el pH de las vacuolas, activando a las enzimas hidrolíticas
ATPasas de tipo F (F de «factor»); también denominadas ATP sintasas			
H^+	Membrana mitocondrial interna	Eucariotas	Generan el gradiente de H^+, que sintetiza ATP
H^+	Membrana del tilacoide	Vegetales	Generan el gradiente de H^+, que sintetiza ATP
H^+	Membrana plásmica	Procariotas	Generan el gradiente de H^+, que sintetiza ATP
ATPasas de tipo ABC (ABC de «ATP-binding cassette»)			
Múltiples solutos*	Membrana plasmática, membrana de orgánulos	Procariotas, eucariotas	Captura de nutrientes; exportación de proteínas; posiblemente también transporte en orgánulos
Fármacos antitumorales**	Membrana plasmática	Células animales tumorales	Eliminan fármacos hidrofóbicos (y productos naturales hidrofóbicos) de la célula

*Iones, azúcares, aminoácidos, péptidos y proteínas.

**Cochicina, taxol vinblastina, actinomicina D y puromicina.

cial electroquímico. La mayoría de las ATPasas de tipo P aparecen en células eucariotas, si bien hay al menos una ATPasa bacteriana de K^+, que pertenece a esta familia de transportadores.

ATPasas de tipo V. **Las ATPasas de tipo V** (V de «vacuola») bombean protones hacia el interior de ciertos orgánulos, como vacuolas, vesículas, lisosomas, endosomas y el complejo de Golgi. La diferencia en la concentración de protones a ambos lados de la membrana de estos orgánulos, oscila entre 10 y 10.000 veces. Estas ATPasas no son inhibidas por el ion vanadato y no se fosforilan durante el transporte. Están formadas por dos componentes multiméricos, uno integral de membrana y otro periférico, que asoma hacia el citosol. Éste último contiene el lugar de unión del ATP y, por tanto, la actividad ATPásica.

ATPasas de tipo F. **Las ATPasas de tipo F** (F de «factor») aparecen en bacterias, mitocondrias y cloroplastos. Están implicadas en el transporte de protones y tienen dos componentes multiméricos. El componente integral, llamado F_o es un poro transmembrana de protones. El componente periférico, llamado F_1, incluye el sitio de unión al ATP. Las ATPasas de tipo F utilizan la energía de la hidrólisis del ATP, para bombear protones contra su potencial electroquímico. Como ya hemos señalado previamente, estas proteínas de transporte pueden facilitar también el proceso contrario, durante el cual, el flujo exergónico de protones a favor de gradiente, se utiliza para **sintetizar ATP**. Cuando funcionan en este último modo, reciben el término más apropiado de ATP sintasas. Ésta es la forma habitual de funcionamiento de estas proteínas en el metabolismo de energía celular, en el cual, la energía de la radiación solar o de reacciones oxidativas exergónicas, se usa para mantener un gradiente transmembrana de protones, que posteriormente servirá para generar el ATP. Volveremos a ver a estas ATP sintasas cuando consideramos los procesos de respiración celular y fotosíntesis, en los Capítulos 10 y 11, respectivamente.

Las ATPasas de tipo F confirman un principio energético importante: *El ATP no es sólo la fuente energética necesaria para generar y mantener los gradientes iónicos, sino que estos gradientes pueden servir como fuente de energía para obtener ATP*. Este principio, que fue descubierto en los estudios de las ATPasas de tipo de F, es la base de la síntesis de ATP en todos los organismos eucariotas y en la mayoría de los procariotas.

ATPasas de tipo ABC. La cuarta clase de bombas impulsadas por ATP es la de las ATPasas de tipo ABC. La designación ABC deriva de «ATP Binding Cassette», donde el término casete hace referencia a los dominios catalíticos de la proteína que unen ATP durante el transporte. Las ATPasas de tipo ABC forman una superfamilia de proteínas transportadoras relacionadas entre sí por secuencias similares y, probablemente, por el mecanismo molecular. La mayor parte de las ATPasas de tipo ABC descubiertas inicialmente, eran de células procarióticas, pero cada vez se descubren más ATPasas en células eucarióticas, muchas de ellas de gran importancia clínica. ¡Se han descrito, por ejemplo, más de 90 genes de ATPasas de tipo ABC en el genoma humano.

Las ATPasas de tipo ABC tienen cuatro dominios, dos de ellos son proteínas integrales de membrana, altamente hidrófobas, mientras que los otros dos son proteínas periféricas, localizadas en la cara citoplásmica de la membrana. Cada uno de los dos dominios integrales consta de seis segmentos transmembrana, que probablemente forman el elemento de paso de las moléculas de soluto. Los dos dominios periféricos son los casetes que unen ATP y acoplan su hidrólisis al proceso del transporte. Estos cuatro dominios son polipéptidos independientes en la mayoría de las células, especialmente las procariotas. Sin embargo, se conocen también ejemplos, en los cuales los cuatro dominios son parte de un gran polipéptido multifuncional.

Mientras que las otras tres clases de ATPasas transportan sólo cationes, las de tipo ABC utilizan una notable diversidad de solutos. La mayoría son específicas para un determinado soluto o un grupo de solutos, estrechamente relacionados entre sí. Tomadas en su conjunto, la variedad de solutos transportados por los numerosos miembros de esta superfamilia es grande, incluyendo iones, azúcares, aminoácidos, e incluso péptidos y polisacáridos. Los transportadores de tipo ABC son muy importantes desde el punto de vista clínico, pues algunos de ellos expulsan antibióticos y otros fármacos, haciendo que la célula sea resistente a los mismos. Por ejemplo, algunos tumores humanos son particularmente resistentes a varias medicinas que, en general, son bastante eficaces en la detención del crecimiento del tumor. Las células de tales tumores tienen concentraciones excepcionalmente altas de una proteína muy grande denominada de **resistencia a multidrogas (MDR)**, que fue, por otra parte, la primera ATPasa de tipo ABC identificada en el hombre. La proteína de transporte MDR se vale de la energía de la hidrólisis del ATP para expulsar de las células a los medicamentos hidrófobos, reduciendo su concentración en el citoplasma y, por tanto, su eficacia como agentes terapéuticos. A diferencia de la mayoría de los transportadores ABC, la proteína MDR tiene una especificidad relativamente baja. Así, puede exportar una amplia gama de medicinas, químicamente distintas, que se usan en la quimioterapia del cáncer, de modo que una célula con la proteína MDR en su membrana celular se hace resistente a una amplia variedad de agentes terapéuticos.

El interés médico de esta clase de proteínas de transporte se acrecentó cuando se demostró que la fibrosis quística era causada por un defecto genético en una proteína de la membrana, estructuralmente relacionada con los transportadores de tipo ABC. Se sabía desde hacía tiempo, que

los pacientes afectados de fibrosis quística, tienen una mucosidad excepcionalmente espesa en sus pulmones, condición esta que, a menudo, deriva en pulmonía y otras patologías respiratorias. Hoy día sabemos que el problema subyacente es la incapacidad de segregar iones cloruro y que el defecto genético está en una proteína que funciona como un canal de dicho ion.

La proteína, llamada *regulador de la conductancia transmembrana en la fibrosis quística (CFTR)*, tiene dos dominios transmembrana, otros dos periféricos, con los sitios de unión del ATP y un dominio regulador hidrófilo (*véase* Figura 8B.1). Los dominios transmembranales y periféricos son similares, en secuencia y topología presuntiva, a los dominios centrales de los transportadores ABC. Sin embargo, la proteína CFTR es un canal iónico, que a diferencia de la mayor parte de las ATPasas de tipo ABC, no requiere ATP durante el transporte. Pese a todo, sí se precisa la hidrólisis ATP para la apertura del canal. En el Anexo 8B se describen los progresos recientes, en el nivel molecular, de nuestro entendimiento de la fibrosis quística.

El transporte activo indirecto está impulsado por gradientes iónicos

A diferencia del transporte activo directo, que es impulsado por la energía liberada en una reacción química, como la hidrólisis del ATP, el transporte activo indirecto (también llamado *transporte activo secundario*) es impulsado por el movimiento de iones a favor de su gradiente electroquímico. Este hecho se descubrió estudiando la toma activa de azúcares, aminoácidos y otras moléculas orgánicas por la célula: La entrada de tales moléculas en contra de su gradiente de concentraciones, está a menudo acoplada a la entrada simultánea de iones sodio (en células animales) o protones (en células vegetales y bacterias), a favor de sus respectivos gradientes electroquímicos.

Estos mecanismos de simporte están tan extendidos, que son los responsables de que las células estén continuamente bombeando iones de sodio o protones hacia el exterior. En las células animales, por ejemplo, la bomba de Na^+/K^+ (de la que hablaremos en breve) mantiene una concentración extracelular relativamente alta de iones de sodio, que sirve como fuerza motriz para la entrada de varios de azúcares y aminoácidos (Figura 8.10). La toma de tales compuestos se considera como una forma de transporte activo indirecto, porque no depende directamente de la hidrólisis de ATP u otra molécula relacionada «de alta energía». Sin embargo, sí se mantiene una dependencia de ATP, aunque indirecta, puesto que su hidrólisis es la que mantiene activa a la bomba de Na^+/K^+, responsable del gradiente del ion sodio. La salida continua de Na^+ por la bomba dependiente de ATP y la entrada del mismo ion (acoplado al simporte de otro soluto) establece una circulación continua de iones sodio a través de la membrana de las células animales.

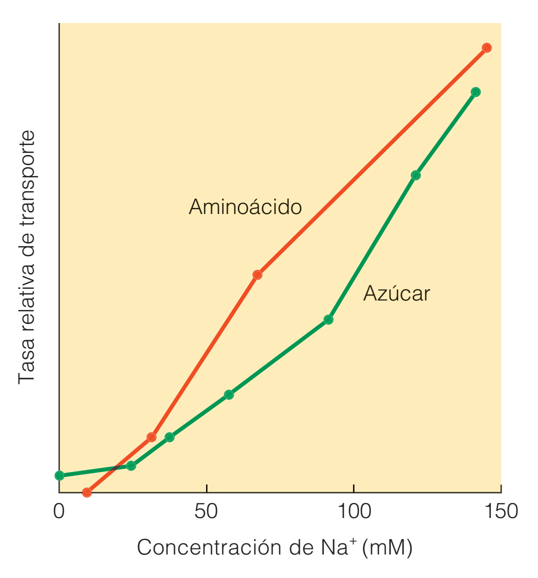


Figura 8.10 Efecto de la concentración del ion sodio extracelular en el transporte de aminoácidos y azúcares. En este experimento, los investigadores variaron la concentración extracelular de los iones sodio y midieron la tasa de entrada del aminoácido glicina en eritrocitos o del azúcar 7-deoxi-D-glucoheptosa en las células del epitelio intestinal. Los estudios de este tipo arrojaron las primeras evidencias de que la entrada de aminoácidos y azúcares en las células, está estimulada por los iones sodio presentes en el medio extracelular.

Mientras que las células animales emplean iones de sodio de para impulsar al transporte activo indirecto, casi todos los demás organismos confían en el gradiente de protones. Por ejemplo, los hongos y las plantas utilizan el simporte de protones para la entrada de solutos orgánicos; el potencial electroquímico de protones se genera y mantiene gracias a una bomba de H^+ dependiente de ATP. Muchos tipos de bacterias, así como las mitocondrias, se valen también del cotransporte de protones para traslocar moléculas de soluto. En todos estos casos, sin embargo, el gradiente de protones se acopla al proceso de transferencia de electrones de la respiración celular, como veremos en el Capítulo 10.

Además del simporte de moléculas orgánicas, como azúcares y aminoácidos, los gradientes de sodio y de protones también pueden servir para *exportar* otros iones, como Ca^{2+} y K^+. Este tipo de transporte activo indirecto suele ser un antiporte, como ocurre, por ejemplo, con el intercambio de iones potasio con protones y de iones calcio con iones sodio.

Ejemplos de transporte activo

Habiendo considerado algunas de las características generales del transporte activo, estamos preparados para abordar tres ejemplos, uno de transporte activo directo en células animales, otro de transporte activo indirecto, también en células animales y, por último un ejemplo muy curioso

de transporte activo mantenido por energía lumínica, propio de ciertas bacterias. En cada caso, indicaremos cuáles son los solutos transportados, cuál la fuerza motriz y cómo se acopla la fuente de energía al mecanismo de transporte. Nos centraremos primero en la *ATPasa* (o *bomba*) de *Na^+/K^+*, presente en todas las células animales, y que constituye un ejemplo bien conocido de transporte activo directo, mediante una ATPasa de tipo P. Después consideraremos un segundo ejemplo en células animales: el *simporte de glucosa/Na^+*, de tipo activo e indirecto, que toma la energía del gradiente del ion sodio establecido por la ATPasa de Na^+/K^+. Por último, consideraremos el caso particular del transporte de protones impulsado por luz en bacterias.

Transporte activo directo: la bomba de NA^+/K^+ mantiene los gradientes iónicos

Un rasgo característico de la mayoría de las células animales es el alto nivel intracelular de iones potasio y el bajo nivel de iones sodio, de forma que la relación $[K^+]_{intracelular}/[K^+]_{extracelular}$ es mucho mayor que 1 (aproximadamente 35:1 en una célula animal típica) y la relación $[Na^+]_{intracelular}/[Na^+]_{extracelular}$ es mucho menor que 1 (aproximadamente 0,08:1 en una célula animal típica). Estas diferencias son necesarias para que las concentraciones totales de solutos se igualen a ambos lados de la membrana, manteniendo así el equilibrio osmótico y evitando el hinchamiento y la lisis celular. Además, los potenciales electroquímicos de potasio y sodio resultantes son esenciales como fuerza motriz en el transporte acoplado, así como para la transmisión de impulsos nerviosos.

La concentración del ion potasio se mantiene generalmente en torno a 100-150 m*M*, en el interior de la mayoría de las células animales, mientras que la concentración externa es mucho menor que ésta, pudiendo fluctuar ampliamente. Por contra, la concentración intracelular de iones de sodio está en torno a 10-15 m*M*, mucho menor que la del medio circundante. El resultado de esto es que, tanto la entrada de iones potasio, como la salida de iones sodio, son procesos que requieren energía.

La bomba responsable de dicho proceso fue descubierta en 1957 por el fisiólogo danés Jens Skou. De hecho, fue la primera descripción documentada de un caso de transporte activo. La bomba emplea ATP como donante de energía y es, por tanto, un ejemplo de ATPasa de transporte. La **ATPasa de Na^+/K^+** o **bomba de Na^+/K^+**, como suele llamarse a esta ATPasa de tipo P, usa la energía desprendida en la hidrólisis del ATP para introducir iones potasio y sacar iones sodio. La bomba de Na^+/K^+aparece en la membrana plasmática de prácticamente todas las células animales, si bien se ha estudiado especialmente en los eritrocitos (*véase* la Figura 8.2d). Como otros muchos transportadores, tiene direccionalidad intrínseca: siempre introduce iones potasio y siempre saca iones sodio. De hecho, los iones sodio y potasio activan a la ATPasa sólo en el lado de la membrana desde el cual son transportados —el sodio desde el interior y el potasio desde el exterior—.

Como los gradientes de sodio y potasio contra los que tiene que luchar la ATPasa de Na^+/K^+ raramente superan el valor de 50:1, la energía requerida para trasladar un ion es relativamente baja (generalmente menos de 2 kcal/mol). Puede deducirse de esto, que la hidrólisis de una molécula de ATP ($\Delta G^{\circ\prime} = -7{,}3$ kcal/mol) es suficiente para transportar varios iones a la vez, circunstancia que se da en realidad en las células animales. La estequiometría puede variar ligeramente en función del tipo celular, pero en los eritrocitos, se expulsan tres iones sodio y se introducen dos iones potasio, por cada molécula de ATP hidrolizada.

La Figura 8.11 representa a la bomba de Na^+/K^+. Es una proteína transmembrana tetramérica, con dos subunidades α y dos β. Las subunidades α presentan lugares de unión para los iones sodio y para el ATP, en la cara citoplásmica de la membrana, así como para el potasio, en la cara externa. Aunque se sabe que las subunidades β están en el lado extracelular y aparecen glicosiladas, su función permanece aún sin clarificar.

La bomba de Na^+/K^+ es una proteína alostérica que presenta dos estados conformacionales, designados E_1 y E_2. La conformación E_1 está abierta hacia el interior celular y es muy afín por los iones sodio, mientras que la E_2 se abre hacia el exterior y une potasio con gran afinidad. La presencia de sodio desencadena la fosforilación de la enzima, estabilizándola en la conformación E_2. Por otro lado, la defosforilación, desencadenada por el K^+, estabiliza a la enzima en la configuración E_1.

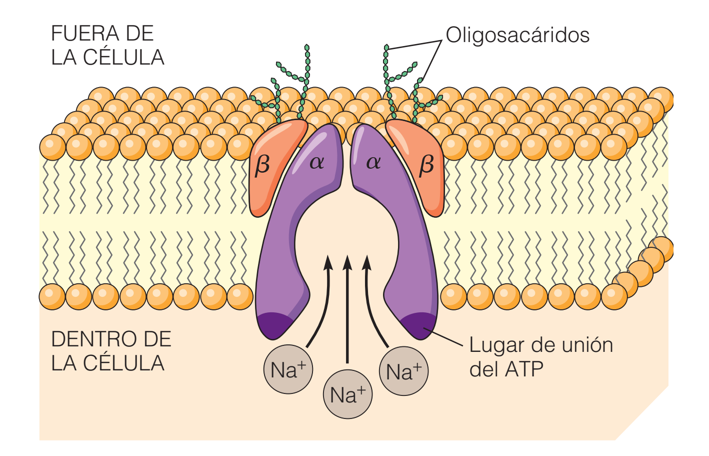


Figura 8.11 **La bomba de Na^+/K^+.** La bomba de Na^+/K^+, presente en la mayoría de las células animales, está formada por dos subunidades α y dos β. Las subunidades α son proteínas transmembrana, con lugares de unión al ATP en su cara citoplásmica. Las subunidades β son proteínas glicosiladas, localizadas en la cara externa de la membrana. La bomba se muestra en su conformación E_1, es decir, abierta hacia el interior celular. La unión de iones sodio causa un cambio conformacional hacia la forma E_2, que se abre hacia el exterior. Los mecanismos de transporte de la bomba se detallan en la Figura 8.12.

Transporte a través de membrana, fibrosis quística y el futuro de la terapia génica

Las proteínas de transporte desempeñan un papel central en la tasa de intercambio y en el control de las moléculas y iones que atraviesan la membrana plasmática. La salud de nuestro cuerpo depende del funcionamiento correcto de muchas de estas proteínas. Si alguna de ellas está alterada, disminuye la probabilidad de que un ion o una molécula puedan atravesar la membrana, lo cual puede derivar en la aparición de una enfermedad.

Un ejemplo que ha atraído por igual la atención de investigadores y médicos, es el de la **fibrosis quística** (**FQ**), una patología fatal, causada por una deficiencia genética en una proteína de transporte de la membrana plasmática. Los órganos más afectados son los pulmones, el páncreas y las glándulas sudoríparas. El principal problema deriva de las complicaciones respiratorias, pues son de difícil tratamiento y en ocasiones, ponen en peligro la vida del enfermo. Las vías respiratorias de un paciente con FQ están a menudo obstruidas por una mucosidad particularmente espesa y son muy vulnerables a infecciones bacterianas crónicas, especialmente por *Pseudomonas aeruginosa*.

Aplicando técnicas de biología molecular y celular, se ha llegado a un conocimiento muy preciso de la enfermedad. Durante los años 80 se demostró que las células de los enfermos de FQ son incapaces de segregar iones cloruro (Cl^-). Las células que revisten los pulmones de un individuo sano, segregan iones cloruro, en respuesta a la presencia de AMP cíclico, mientras que los afectados por la FQ, son incapaces de tal secreción. (El AMP cíclico es una forma de AMP implicada en múltiples procesos de regulación celular; su estructura se muestra en la Figura 14.6). De los experimentos realizados con tejidos tomados de enfermos de FQ, se desprende que la diferencia puede deberse a una proteína de membrana, que en condiciones normales sirve como canal de cloruro.

Muchos de los síntomas de la FQ se pueden explicar por la ausencia de secreción de Cl^-, como se observa en la Figura 8B.1a. En los pulmones de un individuo sano (parte superior del panel), los iones cloruro se segregan desde las células que limitan las vías respiratorias a la luz de dichas vías (la luz es el espacio encerrado por una zona de paso o un conducto). La expulsión de Cl^- por la célula, impulsa el paso simultáneo de iones sodio hacia la luz. Ambos iones arrastran agua osmótica, resultando en la secreción de agua salina. El agua que alcanza así la luz es imprescindible para mantener hidratado el mucus de las vías aéreas. En los pacientes de FQ, no se segregan iones Cl^-, por lo que tampoco hay secreción, ni de iones sodio, ni de agua (parte inferior del panel). Como resultado, el mucus está insuficientemente hidratado, favoreciéndose el crecimiento de bacterias.

En 1989 se produjo un avance clave en el estudio de la FQ, cuando en los laboratorios de Francis Collins, de la Universidad de Michigan y de Lap-Chee Tsui y John Riordan, de la Universidad de Toronto, aislaron el gen deficiente en los enfermos de FQ. El gen codifica una proteína denominada **regulador de la conductancia transmembrana en la fibrosis quística** (**CFTR**). La secuencia de nucleótidos del gen se determinó empleando los métodos descritos en el Capítulo 18 (*véase* Figura 18.14). Una vez conocida la secuencia del gen, se pudo predecir la secuencia aminoacílica y la estructura de la CFTR. Como se muestra en la Figura 8B.1b, se piensa que la proteína tiene dos grupos de *dominios transmembranales*, que la anclan a la membrana plasmática y dos *pliegues de unión de nucleótidos*, que sirven para alojar el ATP necesario para proveer de energía al paso de iones cloruro, a través de la membrana. Además, tiene un dominio citoplásmico muy grande, denominado *dominio regulador*, con varios grupos hidroxilo pertenecientes a serinas, susceptibles de ser fosforilados. A partir de estos estudios se sabe que la proteína CFTR funciona como un canal de cloruro, cuya función se ve afectada cuando, a consecuencia de la mutación del gen CFTR, cambian los sitios fosforilables del dominio de regulación.

Secuenciando los genes *CFTR* de enfermos de FQ, se han podido identificar más de 600 mutaciones. La más común de ellas es la deleción de un único aminoácido en el primer dominio de unión de nucleótidos. La pregunta de cómo la mutación causaba la FQ, permaneció sin respuesta, hasta que los investigadores examinaron la localización de la CFTR en células con y sin mutación. La CFTR normal aparecía en la membrana celular, tal y como podía predecirse. Por contra, la CFTR mutante no se detectaba en la membrana plasmática.

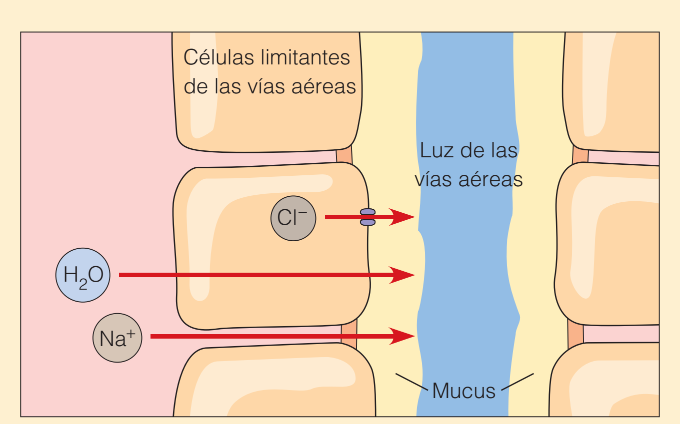
La explicación más plausible es que la CFTR se sintetiza en el retículo endoplásmico rugoso (ER), madura a través del complejo de Golgi y se inserta en la membrana plasmática, siguiendo una ruta que se explicará en el Capítulo 12. La CFTR mutante, sin embargo, queda retenida en el ER, quizá porque se pliegue de forma incorrecta. Cuando esto ocurre, puede ser reconocida como una proteína defectuosa, que será degradada. En consecuencia, la CFTR no aparecerá en la membrana plasmática de las células con FQ y la secreción del ion cloruro no tendrá lugar, desarrollándose la enfermedad.

Con la información que disponen acerca de la FQ, los investigadores tratan ahora de desarrollar nuevos tratamientos e incluso curar la enfermedad. Una de tales aproximaciones es la *terapia génica*, en la cual una copia normal del gen se introduce en las células afectadas. Los investigadores tendrían que dirigir las copias del gen *CFTR* hacia las células de las vías respiratorias de los enfermos de FQ. Estas células deberían ser capaces de sintetizar la forma correcta de la proteína CFTR, que a diferencia de la CFTR mutante, se localizaría en la membrana plasmática, permitiendo la correcta secreción de Cl^- y corrigiendo la patología.

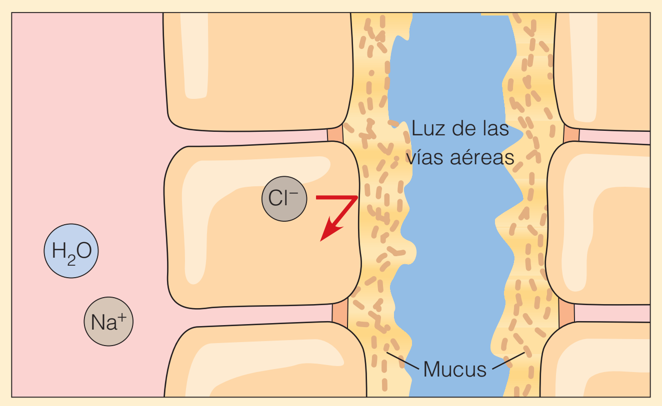
Pero para qué la terapia génica funcione, hay que resolver primero dos problemas de tipo técnico. El gen *CFTR* debe

administrarse de forma eficaz al tejido afectado y su expresión debe regularse, para alcanzar y mantener una producción normal de la proteína CFTR. En la mayoría de los estudios clínicos realizados hasta la fecha, el gen *CFTR* normal se administra a los pacientes de dos formas: el gen se incorpora en el DNA de un virus denominado adenovirus, o se mezcla con gotas lipídicas denominadas *liposomas*. La preparación viral o de liposomas, se proyecta en forma de aerosol en las fosas nasales o los pulmones de los enfermos de FQ, que son luego controlados, para saber si se ha corregido la anomalía en el transporte de cloruro.

En una serie inicial de experimentos con ratones mutantes con FQ, varios grupos de investigadores británicos demostraron que el defecto en el canal del ion cloruro podría ser corregido, cuando se proyectaba el tracto respiratorio con liposomas que contenían el gen *CFTR* normal humano. El mismo método se está empleando, en la actualidad, en ensayos clínicos con pacientes humanos. En uno de tales estudios de «proyección de genes», se administran por vía nasal liposomas que llevan en suspensión el gen *CFTR*. En la mayoría de los pacientes, se ha comprobado que el gen llega y se expresa, si bien la expresión dura muy poco tiempo y el defecto en el canal iónico sólo se corrige parcialmente. Recientemente, Eric Alton y sus colaboradores en Londres, describieron un experimento bien controlado, en el cual administraban los liposomas con o sin el gen *CFTR*, mediante aerosoles proyectados en los pulmones o en las fosas nasales. Se observó una mejoría transitoria en el transporte de cloruro en los pacientes que recibieron el gen *CFTR* , pero no en los pacientes tratados con placebo (liposomas vacíos). Asimismo, comunicaron que se producía una disminución en la adherencia bacteriana a las células del epitelio respiratorio en los pacientes tratados, observación que tiene una importante relevancia clínica. Pese a todo, los progresos son lentos, si bien los investigadores y los médicos están esperanzados con la terapia génica y esperan que algún día llegue a ser un tratamiento real de la FQ.

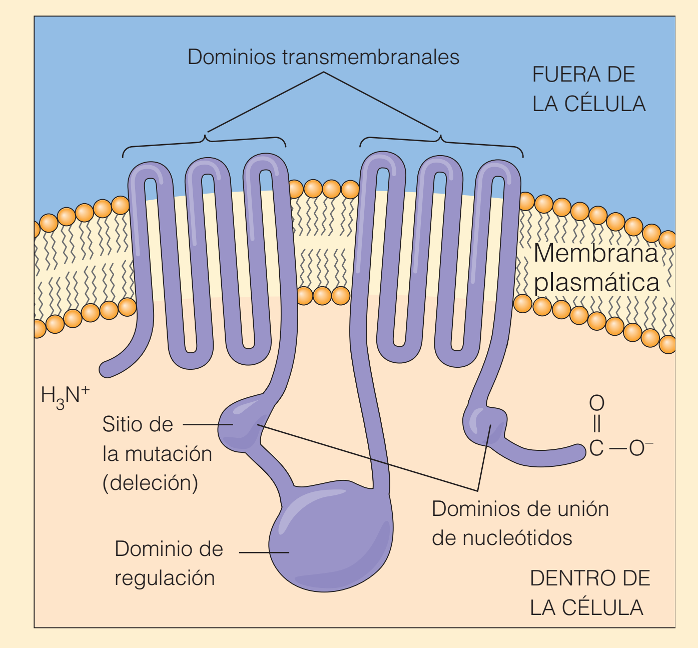


Células limitantes de las vías normales; mucus hidratado



Células de un enforme de fibrosis quística;
mucus deshidratado e infectado por bacterias

(a) Secreción normal y deficiente del ion cloruro



(b) Proteína CFTR

Figura 8B.1 La fibrosis quística y la secreción del ion cloruro. (**a**) La fibrosis quística está causada por un defecto en la secreción de iones cloruro por las células que revisten los pulmones, resultando en una hidratación insuficiente y facilitando el crecimiento bacteriano. (**b**) El regulador de la conductancia transmembrana en la fibrosis quística (CFTR) es una proteína integral de membrana, que funciona como un canal de cloruro. La mutación más habitual en los pacientes de fibrosis quística, está causada por la deleción de un único aminoácido en el primer dominio de unión de nucleótidos de la proteína CFTR.

Como se ilustra esquemáticamente en la Figura 8.12, el mecanismo de transporte implica la unión inicial de tres iones sodio a la forma E_1, en la cara interna de la membrana ① (parte superior derecha). Tras la unión del sodio se activa la fosforilación de la enzima por ATP ② con el consecuente cambio desde la conformación E_1 a la E_2. El resultado es que los iones sodio que se habían atrapado, son ahora desplazados, a través de la membrana, hacia la superficie externa, desde donde se liberan al medio ③. Seguidamente, los iones potasio del exterior se unen a las subunidades α ④, activando la defosforilación y retorno a la conformación original ⑤. Durante este último proceso, los iones de potasio son traslocados a la superficie interna, donde se disocian, dejando al transportador en estado de competencia para aceptar más iones de sodio ⑥.

La bomba de Na^+/K^+ no es sólo uno de los sistemas de transporte mejor conocidos, sino uno de los más importantes para las células animales. Además de mantener las concentraciones intracelulares apropiadas de los iones sodio y potasio, es responsable del potencial que existe a través de la membrana plasmática. No hay que olvidar tampoco la importancia de la bomba, con relación al papel desempeñado por los iones sodio en el transporte de sustancias orgánicas, que consideraremos seguidamente.

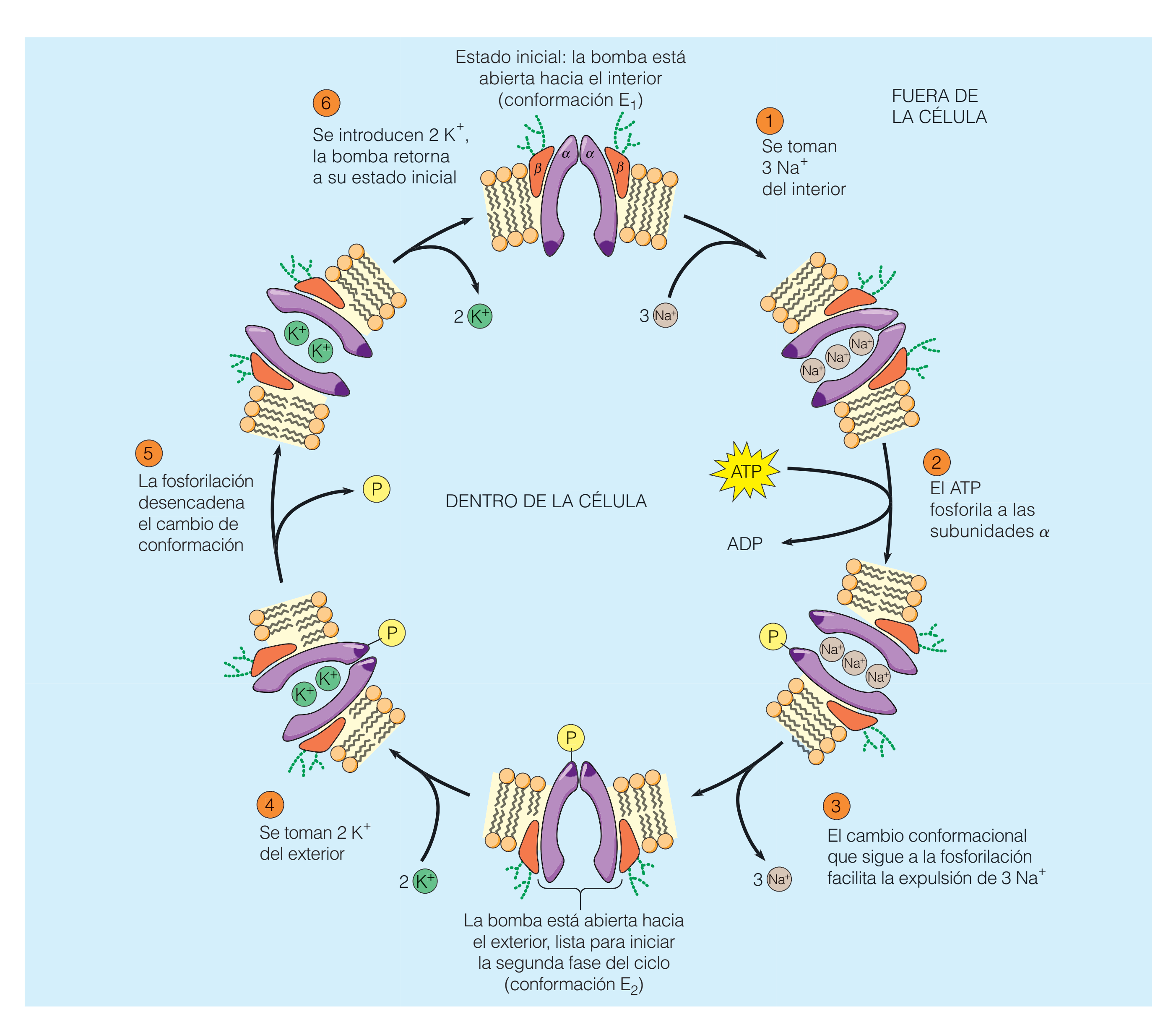


Figura 8.12 Modelo del mecanismo de la bomba de Na^+/K^+. El proceso de transporte se muestra aquí en seis etapas, esquematizadas en la periferia de una célula. La expulsión de iones sodio está acoplada a la entrada de iones potasio, ambos en contra de sus respectivos potenciales electroquímicos. La fuerza motriz resulta de la hidrólisis de ATP, que se requiere además para la fosforilación de la subunidad α de la bomba, en el paso 2. E_1 y E_2 son los estados conformacionales de la proteína, con el canal abierto, respectivamente, hacia el interior (arriba en la figura) o hacia el exterior (abajo en la figura) celular.

Transporte activo indirecto: el simporte de sodio impulsa la entrada de glucosa

El simporte de **Na^+/glucosa** es un buen ejemplo de transporte activo indirecto. Aunque la mayor parte de la glucosa que se transporta en el organismo, lo hace por difusión facilitada, como se ve en la Figura 8.8, las células del epitelio intestinal tienen proteínas transportadoras que permiten tomar la glucosa y ciertos aminoácidos desde la luz intestinal, incluso cuando sus concentraciones son mucho menores aquí que en las células epiteliales. Este proceso endergónico se produce gracias a la toma simultánea de iones sodio, que es exergónica, debido al gradiente de dicho ion a través de la membrana plasmática.

La Figura 8.13 esquematiza el mecanismo de simporte de Na+/glucosa, que requiere la entrada de dos iones sodio por cada molécula de glucosa. El transporte empieza con la unión de los dos iones sodio del medio extracelular a sus lugares de unión en el transportador, que está abierto hacia la superficie externa de la membrana ①. Esto facilita la unión de una molécula de glucosa ② seguida de un cambio conformacional en la proteína, que ahora expone los iones de sodio y la glucosa hacía la superficie interna ③. Los dos iones de sodio se disocian, dada la baja concentración intracelular de sodio ④. El transportador queda ahora bloqueado en su conformación «abierto hacia adentro», hasta que se disocie la molécula de glucosa ⑤, momento en el cual, el transportador vacío puede retornar a su conformación «abierto hacia afuera» ⑥.

El gradiente del ion sodio se mantiene por la continua extrusión de estos iones (flecha discontinua) a través de la bomba de Na^+/K^+ de la Figura 8.12. Así pues, los iones sodio circulan a través de la membrana plasmática, siendo bombeados hacia exterior por la la bomba de Na^+/K^+ y

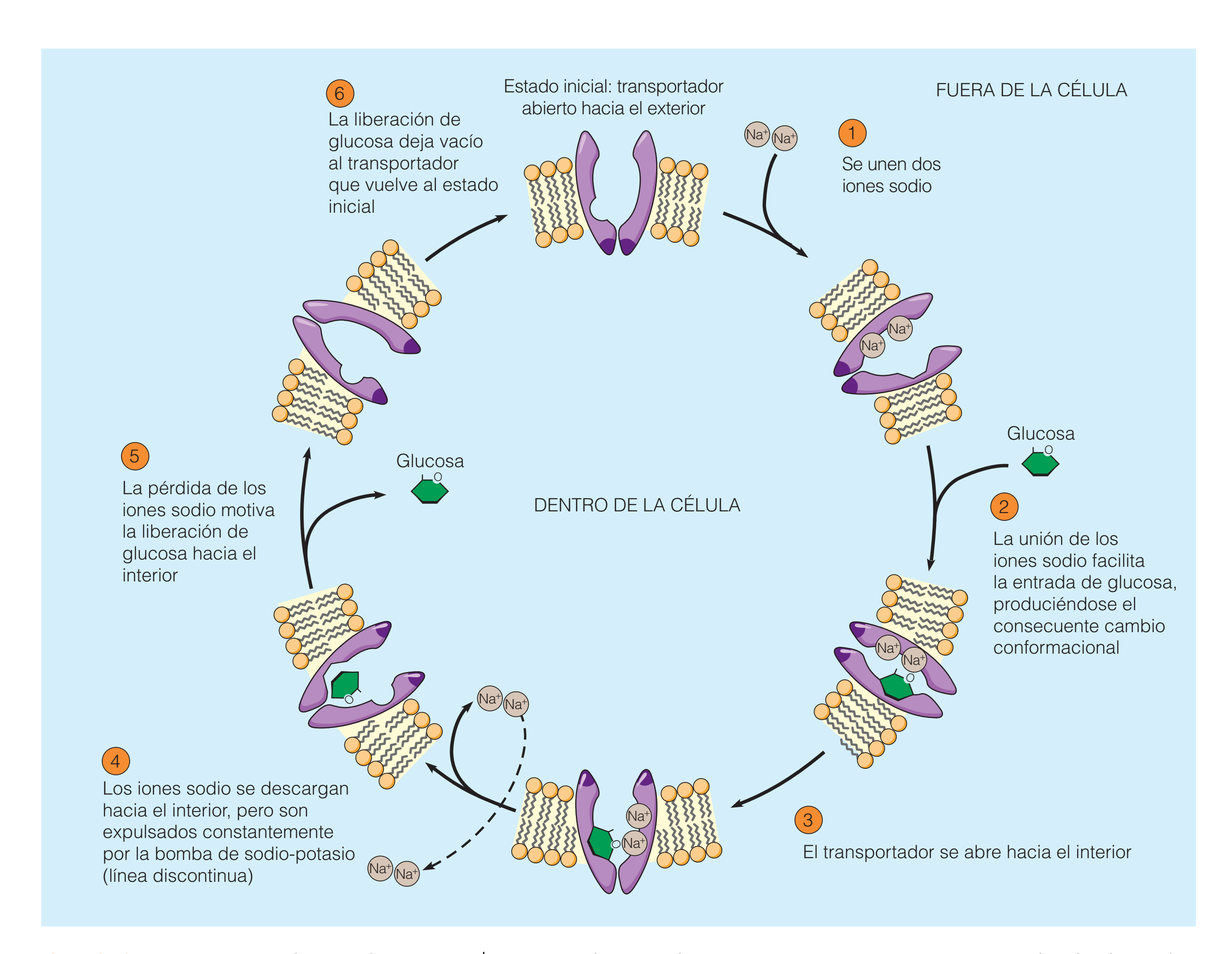


Figura 8.13 **Modelo del mecanismo de simporte de Na^+/glucosa.** El proceso de transporte se esquematiza en seis etapas, distribuidas en el contorno de una célula. La entrada de glucosa en contra de su gradiente de concentración es dirigida por la entrada concomitante de iones sodio a favor del gradiente electroquímico. A su vez, el gradiente de los iones sodio se mantiene constante, debido a su expulsión continua (línea de puntos) a través de la bomba de Na^+/K^+ de la Figura 8.12.

regresando a la célula, a la vez que ceden energía para el simporte de moléculas, tales como la glucosa.

Muy parecido a este mecanismo es el desarrollado por las células animales, para acoplar la entrada de aminoácidos y otros sustratos orgánicos al simporte de sodio. Las células vegetales y las bacterias acoplan la entrada al simporte de protones.

La bomba de protones bacteriorrodopsina se vale de la energía lumínica para transportar protones

El último sistema de transporte activo que vamos a considerar, es el más simple, e implica a una proteína de membrana llamada **bacteriorrodopsina**. Esta proteína, que ya presentamos brevemente en el Capítulo 7, es una bomba de protones de la membrana plasmática de las arqueas halófilas (soportan condiciones de alta salinidad) del género *Halobacterium*. A diferencia de otras proteínas de transporte, que utilizan mecanismos activos directos o indirectos, basados en la energía extraída del ATP o de un gradiente iónico, respectivamente, la bacteriorrodopsina emplea la energía de los fotones de la luz. Esta capacidad es esencial cuando las células se ven privadas de oxígeno, ya que las halobacterias obtienen normalmente la energía a partir del metabolismo oxidativo. La bacteriorrodopsina atrapa la energía lumínica y la usa para introducir protones a través de la membrana, creando un gradiente electroquímico de protones que permite la síntesis del ATP.

El pigmento que absorbe la luz, es decir, el *cromóforo* de la bacteriorrodopsina, es el *retinal*, un derivado carotenoide de relacionado con la vitamina A. (el retinal es también el pigmento visual de la retina de nuestros ojos). El retinal confiere a la bacteriorrodopsina su color púrpura brillante, responsable de de que las halobacterias sean también conocidas como bacterias fotosintéticas púrpuras (Figura 8.14a). La bacteriorrodopsina aparece en la membrana plasmática de las células de *Halobacterium*, en forma de parches coloreados que se denominan *membrana púrpura* (Figura 8.14b).

La bacteriorrodopsina es una proteína integral de membrana, con siete segmentos en α-hélice, orientados de manera que en su conjunto forman una estructura cilíndrica (Figura 8.14c).

El cromóforo retinal suele aparecer en la forma todo-*trans*, unido covalentemente a la cadena lateral de un residuo de lisina, en la posición 216 (Figura 8.14d). Cuando el retinal absorbe un fotón, uno de sus dobles enlaces se isomeriza hacia la forma *cis* de alta energía, con la correspondiente activación de la molécula de bacteriorrodopsina. La molécula fotoactivada es ahora capaz de traslocar protones desde el interior hacia el exterior de la célula. El potencial electroquímico generado por el bombeo de protones hacia el exterior, es utilizado por las ATPasas de la halobacteria para sintetizar ATP.

El bombeo de electrones dependiente de energía es uno de los principios básicos de la energética celular. Las bombas de protones aparecen en todas bacterias, mitocondrias y cloroplastos, siendo el motor vivo por excelencia de la Tierra, pues son imprescindibles en la síntesis de ATP. En los Capítulos 10 y 11 estudiaremos en detalle los mecanismos de generación de los gradientes de protones y el cómo se obtiene la energía que almacenan.

Energética del transporte

Todo evento energético es una transacción de energía; la energía, o bien se libera a la vez que tiene lugar el transporte, o bien se requiere para impulsar a éste. Para entender la energética del transporte, debemos tener en cuenta la existencia de dos factores diferentes. En los solutos sin carga, la única variable es el gradiente de concentración a través de la membrana, que determina si el transporte es a favor de gradiente (exergónico) o en contra de gradiente (endergónico). Sin embargo, si los solutos están cargados, existen, tanto un gradiente de concentración, como un potencial eléctrico a través de la membrana; ambos puede sumarse o bien oponerse el uno al otro, dependiendo de la carga del ion y del sentido del transporte. Analizaremos primero el transporte de sustancias sin carga y consideraremos después las complicaciones adicionales, que surgen cuando las sustancias que atraviesan las membranas, están dotadas de carga.

En el caso de los solutos sin carga, el transporte depende exclusivamente del gradiente de concentraciones

Para los solutos sin carga neta —en otras palabras, moléculas— consideraremos sólo el gradiente de concentraciones a través de la membrana (asumiendo que los cambios en presión, temperatura o volumen son despreciables). Así pues, podemos considerar al proceso de transporte, como una simple reacción química y calcular su ΔG tal y como haríamos con cualquier otra reacción.

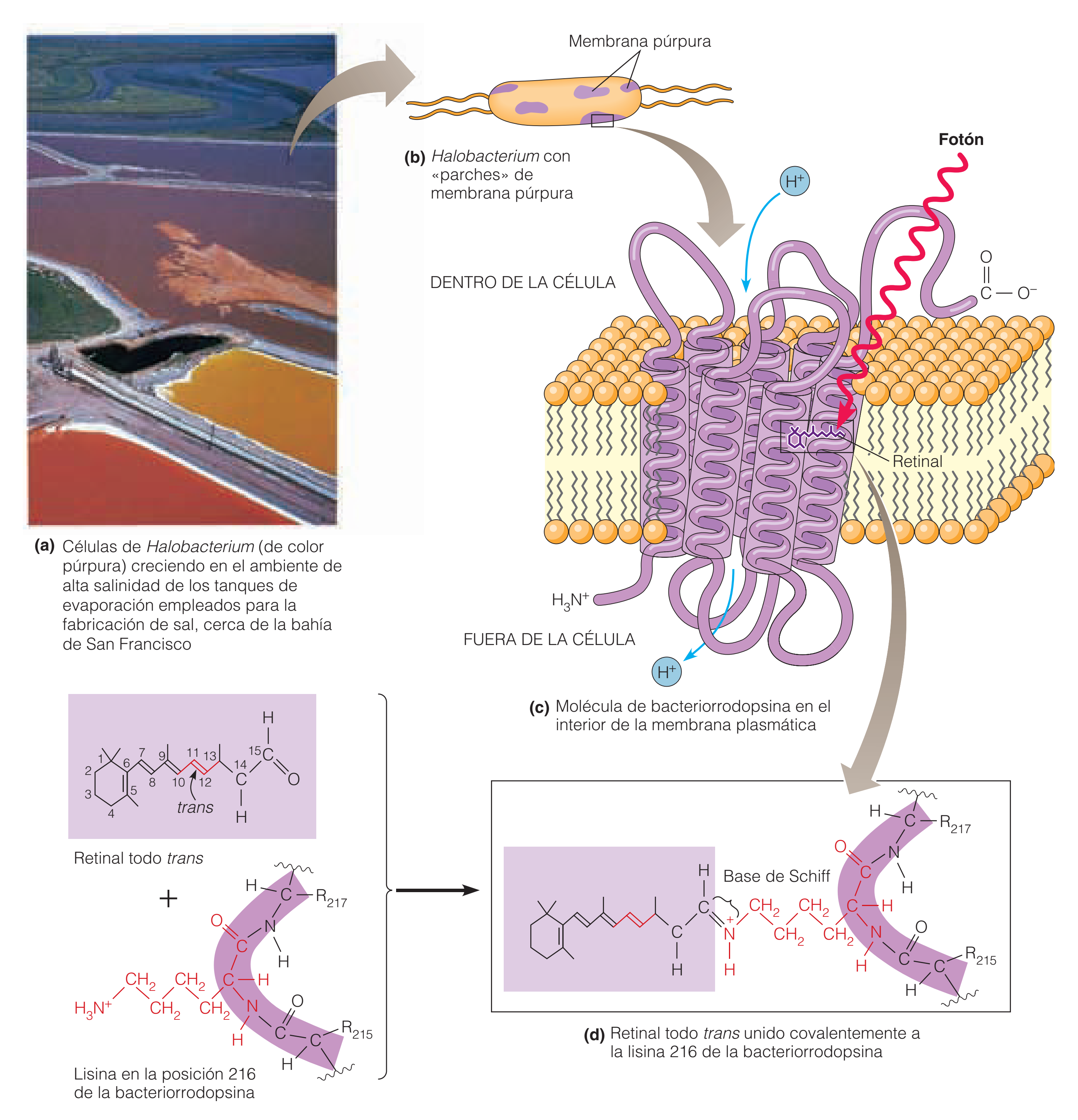
Cálculo de ΔG para el transporte de moléculas. La «reacción» general del transporte de moléculas del soluto *S*, desde la parte externa de un compartimiento rodeado por membrana, hacia el interior del mismo, se puede representar como

$$S_{\text{fuera}} \longrightarrow S_{\text{dentro}} \qquad \textbf{(8.4)}$$

En el Capítulo 5 vimos que la variación de energía libre para esta reacción, se puede escribir como

$$\Delta G = \Delta G^{o} + RT \ln \frac{[S]_{\text{dentro}}}{[S]_{\text{fuera}}} \qquad \textbf{(8.5)}$$

donde ΔG es la variación de energía libre, ΔG^{o} es la variación de energía libre estándar, *R* es la constante de los gases



(a) Células de *Halobacterium* (de color púrpura) creciendo en el ambiente de alta salinidad de los tanques de evaporación empleados para la fabricación de sal, cerca de la bahía de San Francisco

(b) *Halobacterium* con «parches» de membrana púrpura

(c) Molécula de bacteriorrodopsina en el interior de la membrana plasmática

(d) Retinal todo *trans* unido covalentemente a la lisina 216 de la bacteriorrodopsina

Figura 8.14 Bacteriorrodopsina: la bomba de protones de las halobacterias. (**a**) Las bacterias pertenecientes al género *Halobacterium* se caracterizan por su color violeta debido a la presencia de la proteína bacteriorrodopsina. (**b**) La bacteriorrodopsina es una bomba de protones, presente en la membrana plasmática de las células de *Halobacterium*, formando unas áreas de color púrpura brillante, conocidos como parches de membrana púrpura. (**c**) Los siete segmentos transmembranales en α-hélice de la bacteriorrodopsina están separados por segmentos cortos no helicoidales, orientados en la membrana de manera que constituyen una estructura de forma cilíndrica. (**d**) El cromóforo *trans*-retinal se une, en forma de base de Schiff, a la lisina 216 del séptimo segmento transmembranal de la proteína.

(1.987 cal/mol · K), T es la temperatura absoluta y $[S]_{\text{dentro}}$ y $[S]_{\text{fuera}}$ son las concentraciones de S en el interior y en el exterior, respectivamente. Sin embargo, la constante de equilibrio K'_{eq} para el transporte de un soluto sin carga es siempre 1, puesto que en el equilibrio, la concentración del soluto a ambos lados de la membrana será la misma:

$$K'_{eq} = \frac{[S]_{\text{dentro}}}{[S]_{\text{fuera}}} = 1{,}0 \qquad (8.6)$$

lo cual lleva a que ΔG^o es siempre cero:

$$\Delta G^o = -RT \ln K'_{eq} = -RT \ln 1 = 0 \qquad \textbf{(8.7)}$$

Así, la expresión para la ΔG del transporte de entrada para un soluto sin carga, se puede simplificar como sigue

$$\Delta G_{entrada} = +RT \ln \frac{[S]_{dentro}}{[S]_{fuera}} \qquad \textbf{(8.8)}$$

Obsérvese que si $[S]_{dentro}$ es menor que $[S]_{fuera}$, ΔG será negativa, indicando que el transporte de entrada de la sustancia S es exergónico y podrá ocurrir espontáneamente, como cabe esperar de la difusión facilitada a favor de gradiente. Pero si $[S]_{dentro}$ es mayor que $[S]_{fuera}$, el transporte de entrada de S se producirá en contra de gradiente, requiriéndose un aporte de energía, indicado por el valor positivo de ΔG.

Un ejemplo: la entrada de lactosa. Como ejemplo, suponga que la concentración de lactosa en una célula bacteriana debe ser 10 nM, mientras que la concentración en el medio es de sólo 0,2 mM. La energía que se requiere para introducir la lactosa, a 25 °C, se puede calcular a partir de la Ecuación 8.8, como

$$\begin{aligned}\Delta G_{entrada} &= +RT \ln \frac{[\text{Lactosa}]_{dentro}}{[\text{Lactosa}]_{fuera}} \\ &= +(1{,}987)(27.325) \ln \frac{0{,}010}{0{,}0002} \\ &= +592 \ln 50 = +2.316 \text{ cal/mol} \\ &= +2{,}32 \text{ kcal/mol} \qquad \textbf{(8.9)}\end{aligned}$$

En muchas bacterias, la energía para tomar lactosa, proviene del gradiente electroquímico de protones, por lo que la entrada de lactosa en estas células es un ejemplo de transporte activo indirecto.

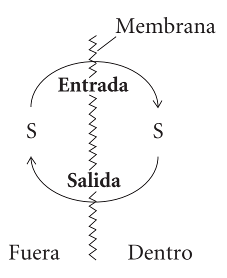
Tal y como está escrita, la Ecuación 8.8 se aplica al transporte de entrada. Para el transporte de salida, las posiciones de $[\text{lactosa}]_{dentro}$ y $[\text{lactosa}]_{fuera}$, se intercambian. El valor absoluto de ΔG es el mismo, pero con el signo cambiado. Como en cualquier otro proceso, cuando el transporte es exergónico en un sentido, a la hora de verificarse en el sentido opuesto, será endergónico y de la misma magnitud. Las ecuaciones para el cálculo de ΔG del transporte de entrada y salida, en el caso de solutos no cargados, se resumen en la Tabla 8.4.

Cuando los solutos están cargados, la ΔG del transporte depende del potencial electroquímico

Para solutos cargados —en otras palabras, iones— necesitamos considerar, tanto el gradiente de concentraciones, como el potencial de membrana, V_m. En las células animales, V_m suele oscilar en el rango de −60 a −90 mV, mientras que en las bacterias y las células vegetales, es significativamente menor, en torno a los −150 mV en bacterias y entre −200 y −300 mV en células vegetales. Por convención, el signo menos indica que la carga negativa está en el lado intracelular. Así pues, el valor de V_m indica cuánto es de negativo el interior de la célula con relación al medio externo (o positivo, en el caso de un signo más).

Tabla 8.4 Cálculo de ΔG para el transporte de solutos cargados y sin carga

Proceso de transporte



ΔG para el transporte de solutos sin carga:

$$\Delta G_{entrada} = +RT \ln \frac{[S]_{dentro}}{[S]_{fuera}}$$

R = 1,987 cal/mol · K
T = K = °C + 273

$$\Delta G_{salida} = +RT \ln \frac{[S]_{fuera}}{[S]_{dentro}}$$

ΔG para el transporte de solutos cargados:

$$\Delta G_{entrada} = +RT \ln \frac{[S]_{dentro}}{[S]_{fuera}} + zFV_m$$

z = cambio de ion
F = 23.062 cal/mol · V
V_m = membrana potencia (en voltios)

$$\Delta G_{salida} = +RT \ln \frac{[S]_{fuera}}{[S]_{dentro}} + zFV_m$$

Evidentemente, el potencial de membrana no tiene efecto sobre los solutos sin carga, pero afecta significativamente a la energética del transporte de iones. Como el potencial de membrana es casi siempre negativo, se favorece la entrada de cationes y se dificulta su salida. Consecuentemente, los aniones se mueven en contra del potencial de membrana, cuando son transportados al interior, y a favor, cuando son expulsados. Como se mencionó anteriormente, el efecto combinado de los gradientes de concentración y de potencial para un ion, se domina *potencial electroquímico* de dicho ion.

Cálculo de ΔG para el transporte de iones. Para determinar la energética del transporte de iones, se deben considerar los dos componentes del potencial electroquímico. El cálculo de ΔG para este tipo de transporte, requiere de una

ecuación con dos términos, uno para expresar el efecto del gradiente de concentración a través de la membrana y el otro para considerar el potencial de membrana.

Suponiendo que S^z representa a un soluto de carga z, el cálculo de ΔG del transporte de entrada de S^z, será

$$\Delta G_{\text{entrada}} = +RT \ln \frac{[S]_{\text{dentro}}}{[S]_{\text{fuera}}} + zFV_{\text{m}} \qquad \textbf{(8.10)}$$

donde R, T y $[S]$ son las mismas que en el caso anterior, z es la carga de S ($+1$, $+2$, -1 o -2), F es la constante de Faraday (23.062 cal/mol · V) y V_{m} es el potencial de membrana (en voltios).

Para el transporte de salida de S, ΔG tiene el mismo valor que el de entrada, pero de signo opuesto, así que podemos escribir

$$\Delta G_{\text{salida}} = -\Delta G_{\text{entrada}}$$

$$= +RT \ln \frac{[S]_{\text{dentro}}}{[S]_{\text{fuera}}} - zFV_{\text{m}} \qquad \textbf{(8.11)}$$

o, intercambiando los términos del logaritmo,

$$\Delta G_{\text{salida}} = +RT \ln \frac{[S]_{\text{fuera}}}{[S]_{\text{dentro}}} + zFV_{\text{m}} \qquad \textbf{(8.12)}$$

Nótese que las Ecuaciones 8.10 y 8.12 son las ecuaciones generales para el transporte de entrada y salida de solutos. La Ecuación 8.8 es la versión simplificada de la Ecuación 8.10, para el caso particular de solutos cuyo valor de z es cero, es decir, para moléculas sin carga neta.

Un ejemplo: la entrada de iones cloruro. Para ilustrar el uso de la Ecuación 8.10 —e incidir en que la intuición no es siempre válida para predecir la dirección del transporte de un ion— considere lo que ocurre cuando una célula nerviosa, cuya concentración intracelular del ion cloruro es de 50 m*M*, se encuentra en una solución que contiene 100 m*M* de Cl^-. Dado que la concentración de Cl^- es el doble en el medio extracelular, podríamos esperar que los iones cloruro difundieran pasivamente hacia el interior de la célula, sin necesidad de transporte activo. Sin embargo, esta predicción no tiene en consideración el potencial de membrana, de unos de −60 mV (−0,06 V), que existe entre ambos lados de la membrana plasmática de una célula nerviosa. El signo menos nos recuerda que el interior de la célula es negativo con respecto al exterior, lo que significa que el movimiento de entrada de los iones cargados negativamente, tales como el Cl^-, se realizará contra el potencial de membrana. Así pues, la entrada de iones cloruro se verifica a favor del gradiente de concentración, pero en contra del gradiente de cargas.

Para cuantificar las magnitudes relativas de esas dos fuerzas opuestas, a 25 °C, podemos emplear la Ecuación 8.10, sustituyendo sus valores:

$$\Delta G_{\text{entrada}} = +RT \ln \frac{[S]_{\text{dentro}}}{[S]_{\text{fuera}}} + zFV_{\text{m}}$$

$$= +(1{,}987)(273+25)\ln\left(\frac{0{,}05}{0{,}10}\right) + (-1)(23.062)(-0{,}06)$$

$$= +592 \ln (0{,}5) + (23.062)(0{,}06)$$

$$= -410 + 1384 = 974 \text{ cal/mol}$$

$$= +\ 0{,}97 \text{ kcal/mol} \qquad \textbf{(8.13)}$$

El hecho de que ΔG sea positiva, quiere decir que, pese a que la concentración del ion cloruro sea el doble fuera que dentro de la célula, la entrada de cloro requerirá energía. Esto es porque el movimiento de un mol de iones cloruro en contra del potencial de membrana, requiere más energía (+1.384 calorías) que la que se libera por el movimiento de un mol de iones cloruro a favor del gradiente de concentración (−410 calorías).

Para ayudarle con los cálculos, las ecuaciones de entrada y salida para el transporte de solutos con carga y sin carga, se incluyen en la Tabla 8.4, que resume las propiedades que termodinámicas de cada uno de estos procesos.

Más allá de iones y moléculas pequeñas: secreción y entrada de macromoléculas y partículas

En este capítulo, nos hemos centrado en los movimientos de entrada y salida de iones y moléculas pequeñas, tanto en las células como sus orgánulos y hemos visto que estos solutos pueden atravesar directamente la membrana, si bien casi siempre precisan de la ayuda de proteínas específicas de transporte. Además de este tráfico, muchas células son capaces de tomar y expulsar sustancias demasiado voluminosas para pasar a través de una membrana, con independencia de sus propiedades de permeabilidad. La *exocitosis* es el proceso empleado por las células para liberar proteínas sintetizadas en el interior de la célula y retenidas en vesículas rodeadas de membrana; la *endocitosis* consiste en la entrada de macromoléculas y otras sustancias, basada en el englobamiento de las mismas, en invaginaciones de la membrana plasmática. Estos dos procesos son exclusivos de células eucariotas. La exocitosis y la endocitosis se considerarán en detalle en el Capítulo 12, pero vamos a describirlas brevemente aquí, por su importante papel en el transporte de macromoléculas y otras sustancias a través de la membrana. (Para un vistazo rápido de estos procesos, *véanse* las Figuras 12.12 y 12.13.)

En la **exocitosis**, las proteínas a secretar se sintetizan en los ribosomas unidos al retículo endoplásmico. Estas proteínas serán posteriormente clasificadas, modificadas y empaquetadas, en vesículas rodeadas de membrana, en el

propio retículo endoplásmico y en el complejo de Golgi. Las *vesículas de secreción* o *gránulos de secreción* y verán su contenido hacia el exterior, después de fusionarse con la membrana plasmática. La secreción puede ser *constitutiva* (descarga continua de vesículas) o *regulada* (liberación rápida y controlada de las vesículas, como respuesta a una señal extracelular específica). De esta manera, las células animales segregan péptidos y proteínas hormonales, mucus, proteínas lácteas y enzimas digestivas. Las células vegetales segregan, tanto enzimas, como proteínas estructurales, propias de la pared célular.

En un proceso complementario, la mayoría de las células eucariotas, llevan a cabo la **endocitosis** como una forma de tomar macromoléculas y otras sustancias del medio extracelular. Para ello, se invagina un segmento pequeño de la membrana plasmática, que se pliega y finalmente se escinde, formando una *vesícula de endocitosis*, que engloba a la sustancia deseada. El término endocitosis incluye a varios procesos que difieren por la naturaleza del material ingerido y por el mecanismo por el cual se internaliza. Así, se definen tres formas, denominadas, *fagocitosis, endocitosis mediada por receptores* y *endocitosis independiente de clatrina.* Como sugiere el término, la endocitosis mediada por receptores —pero no los otros dos tipos— requiere de una proteína denominada *clatrina*, que es una de las múltiples *proteínas de la cubierta*, presentes en la superficie de las *vesículas cubiertas.*

En el Capítulo 12 discutiremos detalladamente la endocitosis y la exocitosis. Para saber cómo se transportan las proteínas dentro y fuera de un orgánulo, consúltese el apartado de *distribución y clasificación de proteínas* del Capítulo 22.

Perspectiva

El transporte selectivo de moléculas y iones a través de las membranas, asegura la entrada y salida de sustancias necesarias para la célula y los compartimientos celulares, en el momento apropiado con la tasa requerida. Las moléculas pequeñas como el O_2 y el etanol atraviesan la membrana por difusión simple. El transporte de los demás solutos, incluyendo a todos los iones y a la mayoría de las moléculas de relevancia biológica, está mediado por proteínas específicas que facilitan el paso de solutos a través de una membrana, que de otra forma resultaría impermeable. Cada una de estas proteínas tiene, al menos una, aunque a menudo varias o incluso muchas, secuencias hidrófobas o de inserción, que retienen a la proteína en la membrana y determinan su mecanismo molecular de acción.

El transporte puede ser a favor o en contra de la concentración de soluto o del potencial electroquímico. El transporte a favor, denominado difusión facilitada, se asegura por proteínas transportadoras y canales proteicos. Los transportadores alternan entre dos estados conformacionales; como ejemplos están el transportador de glucosa y el intercambiador de aniones de la membrana del eritrocito. El transporte de una única molécula se denomina uniporte. El transporte acoplado de dos o más moléculas a la vez, puede verificarse con el movimiento de los dos solutos en un mismo sentido (simporte) o en sentidos opuestos (antiporte). Los canales proteicos permiten la difusión formando auténticos canales hidrófobos que atraviesan la membrana. Existen tres tipos de canales, los iónicos (que intercambian, principalmente, Na^+, K^+, Ca^{2+}, Cl^- y H^+), las porinas y las acuaporinas (que facilitan el movimiento rápido de solutos y agua, respectivamente).

El transporte en contra gradiente, denominado transporte activo, requiere energía procedente de la hidrólisis del ATP, del potencial electroquímico derivado de un gradiente de iones o de la luz. El transporte activo dependiente de la hidrólisis del ATP se produce en cuatro tipos de transportadores, denominados ATPasas de tipo P, V, F y ABC. Como ejemplo podemos citar a la ampliamente extendida ATPasa de Na^+/K^+ (ATPasa de tipo P), que mantiene el potencial electroquímico de sodio y potasio en la membrana plasmática de las células animales. El transporte acoplado a un gradiente electroquímico, depende casi siempre del gradiente de sodio (en células animales) o de protones (en plantas, hongos y en muchas células procariotas). Como ejemplo está el transporte de moléculas orgánicas impulsado por el simporte de Na+. Cuando este sistema funciona en conjunción con la bomba de Na^+/K^+, los iones Na^+ son expulsados continuamente por la bomba, retornando a la célula a la vez que introducen azúcares, aminoácidos y otras moléculas orgánicas. La D*G* del transporte se calcula fácilmente. Para los solutos sin carga, la ΔG depende exclusivamente de gradiente de concentraciones, mientras que en el caso de solutos cargados se deben considerar, tanto de gradiente de concentraciones, como el potencial de membrana.

La comprensión y apreciación de las proteínas de membrana y del transporte a través de la membrana, es esencial para entender muchos aspectos que se considerarán en los capítulos siguientes de este texto.

Problemas

Los problemas de mayor dificultad están marcados con un •.

8.1 **¿Verdadero o falso?** Señale cuáles de los siguientes enunciados, relacionados con el transporte a través de membrana, son verdaderos (V) o falsos (F). En los falsos, cambiar la frase para hacerla cierta.

(a) La difusión facilitada de un catión siempre se realiza desde el compartimiento en el que su concentración es mayor, al de concentración menor.

(b) El transporte activo siempre está acoplado a la hidrólisis de enlaces fosfato de alta energía.

(c) La K_{eq} para la difusión de moléculas polares hacia el exterior de la célula, es menor que 1, porque las membranas son esencialmente impermeables a estas moléculas.

(d) Una concentración de sacarosa 0,25 *M* podría no ser isotónica para una célula de un mamífero, si esta célula tuviera transportadores de sacarosa en su membrana plasmática.

(e) El coeficiente de solubilidad para un soluto determinado es varios órdenes de magnitud menor, si aparece una proteína transportadora del soluto en la membrana.

(f) La membrana plasmática tiene pocos, si alguno, transportadores selectivos para compuestos fosforilados.

(g) El dióxido de carbono y los aniones bicarbonato suelen desplazarse en el mismo sentido, a través de la membrana plasmática del eritrocito.

(h) El tratamiento de una célula animal con un inhibidor específico de la bomba de Na^+/K^+, posiblemente no afecte a la toma de glucosa en cotransporte con sodio.

8.2 Buscando las diferencias. De la siguiente lista de propiedades, indicar cuál (es) pueden servir para distinguir entre cada uno de los pares propuestos.

(a) Difusión simple; difusión facilitada

(b) Difusión facilitada; transporte activo

(c) Difusión simple; transporte activo

(d) Transporte activo directo; transporte activo directo

(e) Simporte; antiporte

(f) Uniporte; transporte acoplado

(g) ATPasa de tipo P; ATPasa de tipo V

Propiedades

1. Sentidos en los cuales se transportan dos solutos.
2. Sentido en el cual se mueve un soluto, con relación a su gradiente de concentración o a su potencial electroquímico.
3. Cinética del transporte de solutos.
4. Requerimiento de energía del metabolismo.
5. Requerimiento del transporte simultáneo de dos solutos.
6. Direccionalidad intrínseca.
7. Inhibición competitiva.
8. Sensibilidad al inhibidor vanadato.

8.3 Mecanismos de transporte. Para cada uno de los siguientes supuestos, contestar con una D, si se trata de difusión simple; con una F, si es difusión facilitada y con una A, si se trata de transporte activo. En cada caso, alguna, todas o ninguna (N) de las opciones puede ser correcta.

(a) Requiere de la presencia de una proteína integral de membrana.

(b) Depende, en primer lugar, de la solubilidad del soluto.

(c) Cuando se duplica el gradiente de concentración de la molécula a ser transportada, se duplica también la velocidad de transporte.

(d) Intervienen proteínas llamadas ATPasas.

(e) El proceso de transporte consume enegía.

(f) Se aplica sólo a solutos apolares pequeños.

(g) Se aplica sólo a iones.

(h) El transporte a través de membrana puede realizarse en cualquier sentido, dependiendo del gradiente de concentración que prevalezca.

(i) $\Delta G^o = 0$.

(j) Se puede calcular la constante de Michaelis (K_m).

8.4 Descartando el modelo de transportador transversal. Durante un tiempo, los especialistas en membranas pensaron que las proteínas de transporte podrían unir una molécula de soluto o un ion, en un lado de la membrana y difundir luego a través de dicha membrana, hasta liberar la molécula de soluto en el otro lado. Hoy día sabemos que este modelo de transportador transversal es, casi con toda seguridad, erróneo. Proponga dos argumentos en contra de tal modelo. Uno de ellos debe basarse en nuestro conocimiento actual de la estructura de la membrana y el otro, en consideraciones termodinámicas.

8.5 Transporte de iones potasio. La mayoría de las células de su organismo bombean iones potasio hacia el interior, para mantener una concentración intracelular que es 35 veces mayor que la extracelular.

(a) ¿Cuál sería el valor de ΔG (a 37 °C) para la entrada de iones potasio en una célula que no tuviera potencial de membrana?

(b) En una célula nerviosa con un potencial de membrana de −60 mV, cuál es el valor de ΔG para la entrada de iones potasio a 37 °C?

(c) En la célula nerviosa del apartado b, ¿cuál es el número máximo de iones potasio que se pueden bombear por la hidrólisis de una molécula de ATP, si la relación ATP/ADP es 5:1 y la concentración de fosfato inorgánico es 10m *M*? (supóngase que $\Delta G^{o\prime} = -7{,}3$ kcal/mol , para la hidrólisis de ATP).

8.5 Gradientes iónicos y síntesis de ATP. Los gradientes iónicos a ambos lados de la membrana de la mayoría de las células, desempeñan un papel esencial en la energética celular. Los gradientes son generados por la hidrólisis de ATP, o bien se emplean para generar ATP, por fosforilación de ADP.

(a) Citar un ejemplo en el que el ATP se use para generar y mantener un gradiente iónico. ¿De qué otra manera se puede generar y mantener un gradiente iónico?

(b) Citar un ejemplo en el que el gradiente iónico se use para producir ATP. ¿Qué otras funciones dependen de los gradientes iónicos?

(c) Asuma que la concentración del ion sodio es 12 m*M* en la célula y 145 m*M* en el exterior y que el potencial de membrana es −90 mV. ¿Puede una célula servirse de la hidrólisis de ATP para exportar dos iones de sodio por cada molécula de ATP hidrolizada, si la relación ATP/ADP es 5, la concentración de fosfato inorgánico es 50 m*M* y la temperatura es de 37 ºC? ¿Y si se expulsaran 3 iones de sodio por cada ATP? Razone las respuestas.

(d) Asuma que una bacteria mantiene un gradiente de protones en la membrana, que hace que el pH intracelular sea 8,0, cuando el extracelular es 7,0 ¿Puede la célula utilizar el gradiente de protones para sintetizar una molécula de ATP por cada protón transportado, si el potencial de membrana es de +180 mV, la temperatura 25 ºC y las concentraciones de ATP, ADP y fosfato inorgánico las mismas que en el Apartado c)? ¿Y si se sintetizara una molécula de ATP por cada dos protones transportados? Razone las respuestas.

8.7 El transporte de los iones de sodio. Se sabe que un protozoo marino bombea sodio hacia el exterior por medio de una ATPasa simple de Na^+, que opera sin el concurso de iones potasio. Las concentraciones intracelulares de ATP, ADP y P_i son, respectivamente, 20, 2 y 1 m*M* y el potencial de membrana es de −75 mV.

(a) Asumiendo que la bomba expulsa tres iones sodio por cada molécula de ATP hidrolizada, ¿cuál será la concentración mínima interna de sodio que se podrá mantener, a 25 °C, cuando la concentración externa del ion es de 150 m*M*?

(b) Si estuviéramos tratando con una molécula sin carga en lugar de con un ion, su respuesta en el apartado a, ¿sería mayor o menor, si el resto de las condiciones permanecieran sin variación? Explíquelo.

8.8 El caso de la acidez de estómago. El jugo gástrico del estómago tiene un pH de 2,0. Esta acidez resulta de la secreción de protones por las células epiteliales de la mucosa gástrica. Las células epiteliales, que están a la temperatura del cuerpo (37 ºC), tienen un pH de 7,0 y un potencial de membrana de −70 mV.

(a) ¿Cuál es la concentración del gradiente de protones en la membrana de las células epiteliales?

(b) Calcule la variación en la energía libre asociada a la secreción de 1 mol de protones en el jugo gástrico, a 37 °C.

(c) ¿Cree usted que el transporte de protones puede estar impulsado por la hidrólisis de ATP, en una relación de una molécula de ATP por protón transportado?

(d) Si los protones pudieran regresar libremente a la célula, calcule el potencial de membrana requerido para que no lo hicieran.

8.9 Cargados o no: ¿es importante? Muchos solutos deben entrar y salir de la célula en sus formas protonadas o ionizadas, o tienen grupos funcionales susceptibles de ser protonados o ionizados. Las moléculas sencillas, como el CO_2, el H_3PO_4 (ácido fosfórico) y el NH3 (amoníaco) están en esta categoría, al igual que las moléculas orgánicas con grupos carboxilo, fosfato y/o amino.

(a) Tomando al amoníaco como ejemplo, ¿cómo se denomina su forma cargada? ¿Cuál es su fórmula química?

(b) ¿Cuál de esas dos formas predominará en una solución con un pH muy ácido? Razone la respuesta.

(c) ¿Cuál de las dos formas se verá afectada, en su entrada en la célula, por el gradiente de concentraciones de la molécula en su forma intracelular? ¿Puede el potencial de membrana afectar al transporte de entrada de alguna de esas dos formas moleculares?

(d) En una célula que tiene que tomar amoníaco del medio, la entrada de la forma cargada, ¿requerirá más o menos energía que la de la forma no cargada, teniendo en cuenta que la célula tiene un potencial negativo? Razone la respuesta.

(e) En vez de amoníaco, considere la entrada de ácido acético, CH_3COOH, un intermediario de importancia en múltiples rutas biológicas. ¿Cuál es la forma cargada en este caso? ¿Cuál de las dos formas se verá afectada, en su entrada a la célula, por el gradiente de concentraciones de la molécula en su forma intracelular? ¿Puede el potencial de membrana afectar al transporte de entrada de alguna de esas dos formas moleculares?

(f) En una célula que tiene que tomar ácido acético del medio, la entrada de la forma cargada, ¿requerirá más o menos energía que la de la forma no cargada, teniendo en cuenta que la célula tiene un potencial negativo? Razone la respuesta.

•**8.10 La bomba de calcio del retículo sarcoplásmico.** La contracción de las células musculares se regula por iones calcio, que es liberado y capturado por el retículo sarcoplásmico (RS). La salida de calcio desde el RS, activa la contracción muscular, mientras que la ATPasa de calcio, devuelve a la célula al estado relajado. Cuando el tejido muscular se homogeneiza, el RS se fragmenta en vesículas denominadas *microsomas*, que retienen la capacidad de tomar calcio. En el experimento de la Figura 8.15, se preparó un medio de reacción con 5 m*M* de Mg^{2+}-ATP y 0,1 M de KCl, con un pH de 7,5. Se añadió a 1 mL del medio de reacción, una alícuota de microsomas, que contenía 1,0 mg de proteína. Posteriormente se añadieron 0,4 mmoles de calcio. Dos minutos después se añadió un ionóforo de calcio. (Un ionóforo es una sustancia que facilita el movimiento de un ion a través de una membrana.) En cada adición, se registró la actividad ATPásica, obteniéndose los resultados expresados en la figura.

(a) ¿Cuál es la actividad ATPásica, expresada como micromoles de ATP hidrolizados por miligramo de proteína y minuto?

(b) La ATPasa se activa por calcio, como se observa por el incremento en la hidrólisis del ATP, cuando se añade calcio

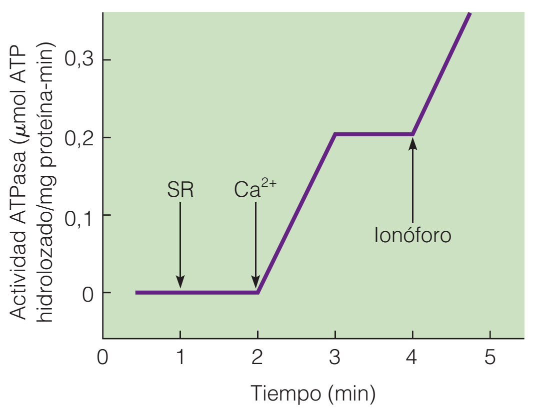


Figura 8.15 Toma de calcio por el retículo sarcoplásmico. *Véase* el Problema 8.10.

y por la disminución en la hidrólisis, cuando el calcio baja por efecto de la adición de los microsomas, un minuto después. ¿Cuántos iones de calcio entran por cada ATP hidrolizado?

(c) La última adición es la del ionóforo de calcio. ¿Cuándo se restablece la hidrólisis del ATP?

•**8.11** **Vesículas invertidas.** En el estudio del transporte ha sido esencial el desarrollo de los métodos que permiten obtener vesículas cerradas, a partir de membranas, que son funcionales para ciertos sistemas de transporte. Así, se han podido generar vesículas a partir de membranas de eritrocitos, en las cuales la orientación de la membrana es la de la célula (con el interior hacia dentro) o la inversa (el interior hacia afuera). En estas vesículas, la ATPasa de Na^+/K^+ es funcional. Sellando las vesículas en un medio y transfiriéndolas luego a otro, es posible tener ATP, iones sodio y iones potasio, bien dentro de la vesícula, bien fuera o bien, en ninguno de los dos lados.

(a) Sugiera una o dos ventajas de estas vesículas respecto a los eritrocitos intactos, con relación al estudio de la bomba de Na^+/K^+. ¿Habría alguna desventaja?

(b) En las vesículas invertidas, indicar cuáles de las siguientes moléculas deberían estar dentro de la vesícula (D), fuera (F) o ausentes (A), para conseguir demostrar la hidrólisis del ATP: Na^+, K^+ y ATP.

(c) Si tuviera que dibujar la gráfica de la hidrólisis del ATP respecto al tiempo, ¿qué tipo de curva esperaría obtener?

•**8.12** **Inhibición por ouabaína.** La ouabaína es un inhibidor específico del transporte activo de iones sodio hacia el exterior y, por tanto, es una herramienta muy valiosa para el estudio de los mecanismos de transporte. ¿Cuáles de los siguientes procesos de su propio cuerpo, esperaría usted que fueran sensibles a la inhibición por ouabaína? Razone las respuestas en cada caso.

(a) Difusión facilitada de glucosa en una célula muscular.

(b) Transporte activo de la fenilalanina de la dieta, a través de la mucosa intestinal.

(c) Captura de iones potasio por los eritrocitos.

(d) Entrada activa de lactosa en las bacterias intestinales.

•**8.13** **Deduciendo la estructura.** Al igual que para la mayoría de las proteínas de la membrana, la estructura tridimensional del transportador GLUT1 de la glucosa, todavía no ha sido determinada por cristalografía de rayos X, debido a las dificultades encontradas en la obtención de cristales. Sin embargo, los biólogos celulares han deducido su estructura probable, basándose en la secuencia de aminoácidos y en varios datos topológicos. Usando la siguiente información, proponga la estructura de GLUT1 e indique cómo se puede organizar la proteína de la membrana.

1. GLUT1 está formado por un único polipéptido de 492 aminoácidos.
2. La proteína tiene 12 segmentos hidrófobos, cinco de los cuales (3.º, 5.º, 7.º, 8.º y 11.º) tienen tres o cuatro residuos aminoacílicos polares o con carga, a menudo separados por varios residuos hidrófobos. (Nota: hay unos 3,5 residuos por vuelta en una proteína en hélice α.)
3. Cuando una hélice con un residuo polar en cada tercera o cuarta posición se ve desde un extremo, los residuos hidrófilos se agrupan hacia un lado de la hélice.
4. La asociación lateral de cinco de tales hélices, cada una con su lado hidrófilo orientado hacia el interior, puede generar un canal transmembrana limitado por residuos polares y cargados, que puede formar enlaces transitorios de hidrógeno con la glucosa, mientras ésta se desplaza a través del canal.

Bibliografía recomendada

Referencias generales

Assmann, S. M. y L. L. Haubrick. Transport proteins of the plant plasma membrane. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8 (1996): 458.

Baldwin, S. A., ed. *Membrane Transport: A Practical Approach.* New York: Oxford University Press, 2000.

Bernhardt, I. C. y J. C. Ellory, eds. *Membrane Transport in Red Blood Cells in Health and Disease.* Berlin: Springer Verlag, 2003.

Hoffman, J. F. y M. J. Welsh, eds. *Molecular Biology of Membrane Transport Disorders.* New York: Plenum, 1996.

Van Winkle, L. J. *Biomembrane Transport.* San Diego: Academic Press, 1999.

Difusión facilitada

Henderson, P. J. F. The 12-transmembrane helix transporters. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5 (1993): 708.

Jiang, Y., A. Lee, J. Chen, M. Cadene, B. T. Chait y R. MacKinnon. The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 417 (2002): 523.

King, L. S. y P. Agre. Pathophysiology of the aquaporin water channels. *Annu. Rev. Physiol.* 58 (1996): 619.

Malandro, M. S. y M. S. Kilberg. Molecular biology of mammalian amino acid transporters. *Annu. Rev. Biochem.* 65 (1996): 305.

Quick, M. W. *Transmembrane Transporters.* New York: Wiley-Liss, 2002.

Silverman, M. Structure and function of glucose transporters. *Annu. Rev. Biochem.* 60 (1994): 757.

van Os, C. H., E.-J. Kamsteeg, N. Marr y P. M. T. Deen. Physiological relevance of aquaporins: Luxury or necessity? *Eur. J. Physiol.* 440 (2000): 513.

Verkman, A. S. y A. K. Mitra. Structure and function of aquaporin water channels. *Amer. J. Physiol.* 278 (2000): F13.

Zeuthen, T. y W. D. Stein. *Molecular Mechanisms of Water Transport Across Biological Membranes.* San Diego: Academic Press, 2002.

Transporte activo

Abrahamson, J., I. Smirnova, V. Kaho, G. Verner, H. R. Kaback y S. Iwata. Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli. Science* 301 (2003): 610.

Chang, G. Multidrug resistance ABC transporters. *FEBS Lett.* (2003): 102.
Efferth, T. Adenosine triphosphate-binding cassette transporter gene in ageing and age-related diseases. *Ageing Res. Rev.* 2(2003): 11
Higgins, C. F. y K. J. Linton. The xyz of ABC transporters. *Science* 293 (2001): 1782.
Hirai, T. y S. Subramaniam. Structural insights into the mechanism of proton pumping by bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.* 545 (2003): 2.
Horisberger, J. D., V. Lemas, J. P. Krahenbuhl y B. C. Rossier. Structure-function relationships of the Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Physiol.* 53 (1991): 565.
Kaback, H. R., M. Sahin-Tóth y A. B. Weinglass. The kamikaze approach to membrane transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (2001): 610.
Kawasaki-Nishi, S., T. Nishi y M. Forgac. Proton translocation driven by ATP hydrolysis in V-ATPases. *FEBS Lett.* 545 (2003): 76.
Kühlbrandt, W. Bacteriorhodopsin—the movie. *Nature* 406 (2000): 569.
Lanyi, J. K. *Bacteriorhodopsin.* Amsterdam: Elsevier, 2000.
Luecke, H., B. Schobert, H. T. Richter, P. Cartailler y J. K. Lanyi. Structural changes in bacteriorhodopsin during ion transport at 2 angstrom resolution. *Science* 286 (1999): 255.
Mercer, R. W. Structure of the Na,K-ATPase. *Internat. Rev. Cytol.* 137C (1993): 139.
Stevens, T. y M. Forgac. Structure, function, and regulation of the vacuolar (H^+)-ATPpase. *Annu. Rev. Cell Biol.* 13 (1997): 779.
Wright, E. M., D. D. F. Loo, E. Turk y B. A. Hirayama. Sodium cotransporters. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8 (1996): 468.

Anexo 8B: Transporte a través de membrana, fibrosis quística y el futuro de la terapia genética

Alton, E. W. F. W., M. Stern, R. Farley *et al.* Cationic lipid-mediated *CFTR* gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis: A double-blind placebo-controlled trial. *Lancet* 353 (1999): 947.
Collins, F. S. Cystic fibrosis: Molecular biology and therapeutic implications. *Science* 256 (1992): 774.
Porteous, D. J., J. R. Dorin, G. McLachlan *et al.* Evidence for the safety and efficacy of DOTAP cationic liposome mediated *CFTR* gene transfer to nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther.* 4 (1997): 210.
Welsh, M. J. y A. E. Smith. Cystic fibrosis. *Sci. Amer.* 273 (diciembre de 1995): 52.

9

Metabolismo de la energía quimiotrófica: glucolisis, fermentación

Como hemos visto en capítulos anteriores, las células no pueden vivir sin una fuente de energía y una fuente de «ladrillos» químicos —las pequeñas moléculas a partir de las que se sintetizan macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos. En muchos organismos, entre ellos usted y yo, estos dos requerimientos están relacionados. Tanto la energía necesaria, como las moléculas pequeñas, están presentes en los componentes que estos organismos producen o ingieren.

En este capítulo y en el siguiente, vamos a considerar *cómo los organismos quimiótrofos,* tanto los animales como la mayoría de los microorganismos, obtienen energía de la comida que ingieren y nos centraremos especialmente en la degradación oxidativa de las moléculas de azúcar. Más tarde, en el Capítulo 11, explicaremos el proceso por el cual los fotótrofos, como las plantas verdes, las algas y algunas bacterias, captan la radiación solar, que es la **última** fuente de energía para casi todos los seres vivos. Es preciso recordar, sin embargo, que las reacciones a partir de las que las células obtienen energía, también pueden proporcionar las pequeñas moléculas necesarias para la síntesis de macromoléculas y otros componentes celulares.

Considerando en estos capítulos el flujo de energía celular, nos vamos a centrar especialmente en las fuentes de energía disponibles para el mundo biológico y en los procesos de conversión y utilización de energía en las células. Para ello, nos referiremos a conceptos que se han mencionado en capítulos anteriores. En el Capítulo 5, por ejemplo, consideramos $\Delta G'$, la variación de energía libre, y cómo este parámetro determina la dirección en la que tendrá lugar la reacción y cuánta energía libre puede liberarse (o ser requerida) por el sistema durante la reacción. En el Capítulo 6 aprendimos que casi todas las reacciones en las células están catalizadas por enzimas y que la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente depende de varios factores, como la temperatura, el pH y las concentraciones de sustratos y productos. En los Capítulos 7 y 8 describimos las membranas que definen los límites de la célula y sus compartimentos y aprendimos cómo se utiliza la energía para el transporte de varias moléculas a través de estas membranas. En los siguientes capítulos, consideraremos otros procesos y reacciones celulares que también requieren energía.

Rutas metabólicas

Cuando describimos las enzimas en el Capítulo 6, consideramos reacciones químicas individuales catalizadas por enzimas concretas funcionando aisladamente. Sin embargo, ésta no es la forma en la que se verifican dichos procesos en la célula. Para abordar cualquier tarea importante, una célula lleva a cabo una serie ordenada y secuencial de reacciones. Esto, en definitiva, supone la participación de muchas enzimas diferentes ya que la mayoría catalizan una sola reacción y normalmente muchas de estas reacciones son necesarias para desarrollar una actividad bioquímica más compleja.

Cuando consideramos todas las reacciones químicas que ocurren dentro de la célula, hablamos de **metabolismo** (de la palabra griega *metaballein*, que significa «cambiar»). El metabolismo global de una célula consiste, en definitiva, en muchas **rutas metabólicas** específicas, cada una de ellas para una operación concreta. Desde la perspectiva de los

bioquímicos, *la vida a nivel celular se puede definir como una red integrada de reacciones metabólicas cuidadosamente acopladas en la que cada una de ellas contribuye a la suma de las actividades que la célula debe llevar a cabo.*

Las rutas metabólicas son de dos tipos generales. Las rutas en las que se sintetizan componentes celulares se denominan «**rutas anabólicas**» (utilizando el prefijo griego *ana-* que significa «hacia arriba»), mientras que aquéllas implicadas en la degradación de constituyentes celulares se denominan «rutas catabólicas» (usando el prefijo griego *kata-* que significa «hacia abajo»). Las rutas anabólicas normalmente implican un incremento sustancial del orden molecular (y por lo tanto una disminución local de la entropía) y son *endergónicas* (requieren energía). Las rutas catabólicas, por otro lado, son *exergónicas* (liberan energía), en parte debido a que implican una disminución en el orden molecular (incremento de entropía). Las rutas catabólicas tienen dos papeles en la célula: Liberar la energía libre necesaria para las funciones celulares y generar las pequeñas moléculas orgánicas o *metabolitos*, que son los ladrillos de construcción para la biosíntesis. Estos dos papeles son complementarios, ya que parte de la energía libre liberada por las reacciones catabólicas se utiliza para en rutas anabólicas en las que se sintetizan macromolecúlas y otros componentes celulares a partir de metabolitos como los azúcares, aminoácidos y nucleótidos.

Como veremos brevemente, las reacciones catabólicas pueden tener lugar tanto en presencia como en ausencia de oxígeno (es decir, tanto en condiciones *aerobias* como *anaerobias*). La producción energética es mucho mayor en presencia de oxígeno, lo que explica la preponderancia de organismos aeróbicos en el mundo. Sin embargo, el catabolismo anaerobio también es importante, no sólo para organismos que se encuentran en entornos pobres en oxígeno sino también para organismos y células que están temporalmente privados de oxígeno.

ATP: el acoplador universal de energía

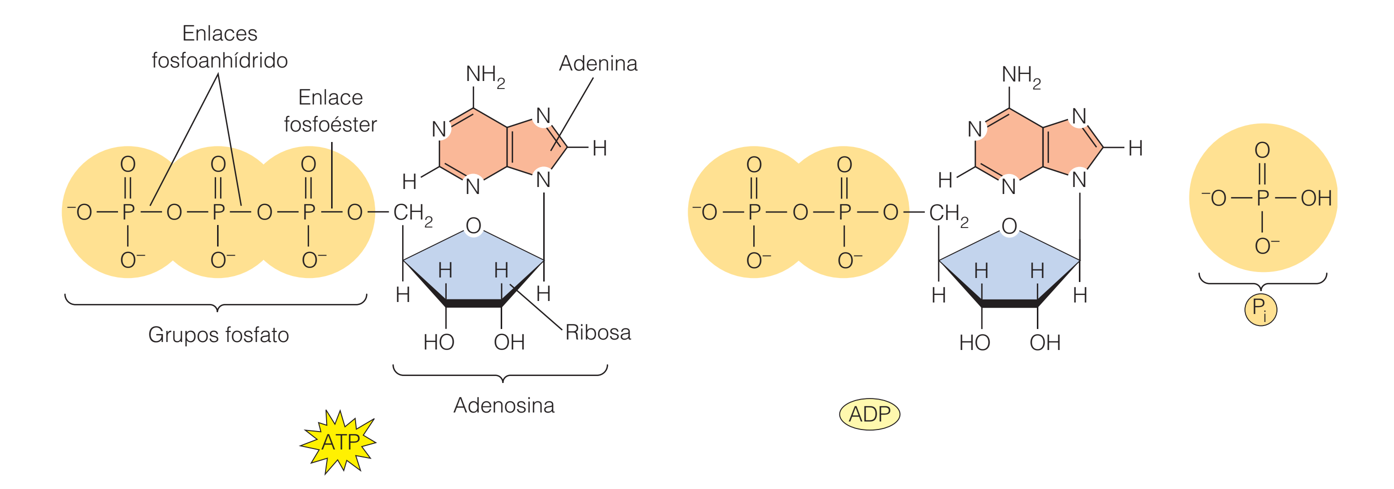
Las reacciones anabólicas son las responsables de los procesos de crecimiento y reparación en las células mientras que las reacciones catabólicas liberan la energía necesaria para llevar a cabo las reacciones anabólicas y otras reacciones celulares. Así, para las funciones celulares es crucial un acoplamiento o *nexo eficaz* entre los procesos que aportan energía y aquellos que la requieren. Este acoplamiento puede darse gracias a determinados tipos de moléculas que mantienen la energía derivada de las reacciones exergónicas y la liberan de nuevo cuando y donde es requerida. La molécula más comúnmente utilizada como intermediario energético es el compuesto fosforilado **adenosina trifosfato (ATP).** El ATP es, en otras palabras, la «divisa» energética del mundo biológico. El ATP está implicado en la mayoría de las transacciones energéticas celulares, por lo que es fundamental que conozcamos su estructura y función, así como las propiedades que hacen a esta molécula tan adecuada para funcionar como adaptador universal de energía.

El ATP tiene dos enlaces fosfoanhídrido ricos en energía

En el Capítulo 3 vimos que el ATP es una molécula compleja que contiene la base aromática adenina, el azúcar de 5 carbonos ribosa y una cadena de 3 grupos fosfato. Los grupos fosfato están conectados entre sí por **puentes fosfoanhídrido** y la ribosa por medio de un **enlace fosfoéster,** como se muestra en la molécula de ATP de la Figura 9.1. El compuesto formado por la unión de adenina y ribosa se denomina *adenosina.* La adenosina puede encontrarse en la célula de forma no fosforilada o con uno, dos o tres fosfatos unidos al carbono 5 de la ribosa, formando *adenosina monofosfato (AMP), difosfato (ADP) y trifosfato (ATP),* respectivamente.

La molécula de ATP es un buen intermediario del metabolismo energético celular ya que la hidrólisis del tercer enlace fosfato (el más externo) libera energía. (*Hidrólisis* es el término general para las reacciones en las que un enlace molecular se rompe por reacción con el agua. En este tipo de reacción se generan dos productos: uno recibe un —H de la molécula de agua y el otro gana un grupo —OH). Así, la hidrólisis de ATP —es decir, su reacción con el agua para formar ADP y fosfato inorgánico (HPO_4^{2-}, conocido como P_i)— es exergónica, con un cambio de energía libre estándar ($\Delta G^{o\prime}$) de $-7{,}3$ kcal/mol (Figura 9.1, Reacción 1). La reacción inversa, en la que se sintetiza ATP a partir de ADP y P_i con pérdida de una molécula de agua por condensación, es por lo tanto endergónica, con un $\Delta G^{o\prime}$ de $+7{,}3$ kcal/mol (Figura 9.1, Reacción 2). Como usted puede ver, se requiere energía para la síntesis de ATP a partir de ADP y esta energía es liberada de nuevo en la hidrólisis del ATP.

A veces, los bioquímicos se refieren a los enlaces fosfoanhídridos del ATP, como de «alta energía» o enlaces «ricos en energía», una convención habitual introducida en 1941 por Fritz Lipmann, un importante investigador de la época en bioenergía. Es necesario entender estos términos correctamente para evitar la impresión errónea de que es el enlace en sí mismo el que contiene energía que puede liberarse. La ruptura de todos los enlaces químicos *requiere* energía y su formación *libera* energía. Lo que queremos decir con «enlace *rico en energía*» es que la energía libre se libera cuando se hidroliza el enlace. Así, la energía es una característica de la reacción en que la que está implicada la molécula y no del enlace concreto de la molécula. Por tanto, decir que el ATP o cualquier otra molécula es un «compuesto rico en energía o de alta energía» debe considerarse una forma abreviada de decir que la hidrólisis de uno o más de estos enlaces es altamente exergónica.



(a) Estructuras del ATP, el ADP y el fosfato inorgánico (a pH 7)

Reacción 1: Hidrólisis ($\Delta G^{\circ\prime} = -7{,}3$ kcal/mol)

$$ATP^{4-} + H_2O \rightleftharpoons ADP^{3-} + P_i^{2-} + H^+$$

Rección 2: Síntesis de ATP ($\Delta G^{\circ\prime} = +7{,}3$ kcal/mol)

(b) Ecuación del balance químico para las reacciones de hidrólisis y síntesis de ATP

Figura 9.1 Hidrólisis y síntesis de ATP. **(a)** El ATP consta de una adenosina (adenina + ribosa) con una cadena de grupos fosfato unidos al átomo de carbono 5 de la ribosa. **(b)** *Reacción 1:* la hidrólisis de ATP en ADP y fosfato inorgánico (P_i) es una reacción altamente exergónica, con una diferencia de energía libre de −7,3 kcal/mol. (El protón que se representa como producto de la reacción se genera por ionización del ADP tras la hidrólisis). *Reacción 2:* la síntesis de ATP por fosforilación de ADP es altamente endergónica con una diferencia de energía libre de alrededor +7,3 kcal/mol.

La hidrólisis del ATP es altamente exergónica debido a la repulsión electrostática y a la estabilización por resonancia

¿Qué hace que la hidrólisis de los enlaces fosfoanhídrido del ATP sea tan exergónica? Esta pregunta tiene dos respuestas: la hidrólisis de ATP en ADP y P_i es exergónica debido a la *repulsión electrostática* entre los grupos fosfato adyacentes cargados negativamente y a la *estabilización* de los dos productos (ADP y fosfato inorgánico) por resonancia.

La **repulsión electrostática** es fácil de entender. Por hacer una analogía, imagine que tiene 2 imanes juntos, en contacto por sus polos. Como sus polos se repelen, usted necesita hacer fuerza (es decir, necesita aplicar energía al sistema) para aproximarlos. Si los deja, los imanes se alejan, liberando la energía. Ahora considere los tres grupos fosfato del ATP. Como se muestra en la Figura 9.1, cada grupo lleva al menos una carga negativa debido su estado de ionización al pH casi neutro de la célula. Estas cargas negativas tienden a repelerse entre sí, distendiendo el enlace covalente que mantiene los grupos fosfato. De la misma forma, la síntesis de ATP requiere la unión de dos moléculas (ADP^{3-} y P_i^{2-}) cargadas negativamente que se repelen y por lo tanto se requiere un aporte de energía para vencer esta repulsión.

La **estabilización por resonancia** es una segunda contribución importante al enlace energético del ATP. Para comprender este fenómeno, debemos apreciar que, aunque algunos grupos funcionales como los carboxilatos o los grupos fosfato suelen representarse con un doble enlace y uno o más enlaces de oxígeno sencillos, en realidad tienen un número indeterminado de pares de electrones deslocalizados sobre todos los enlaces de oxígeno. La verdadera estructura de los carboxilatos y los grupos fosfato es en realidad una media de todas las estructuras que se denomina **híbrido de resonancia,** en el que los electrones extra están deslocalizados sobre todos los posibles enlaces, como se muestra en el grupo carboxilato de la Figura 9.2a.

Cuando estos electrones presentan la máxima deslocalización, una molécula se encuentra en su configuración

(estructuras contribuyentes) (híbrido de resonancia)

(a) Estabilización del grupo carboxilo por resonancia

Enlace éster

(b) Formación del enlace éster

Enlace anhídrido

(c) Formación del enlace anhídrido

Figura 9.2 Disminución de la estabilización por resonancia de los grupos fosfato y carboxilo debido a la formación del enlace. La estabilización por resonancia es una característica importante de los grupos carboxilato y del ion fosfato. En ambos casos el par de electrones que se suele representar localizado sobre uno de los enlaces de oxígeno de las estructuras que contribuyen al híbrido se encuentra en realidad deslocalizado sobre todos los enlaces C—O o P—O, como se representa en el grupo carboxilato en (**a**). Los electrones deslocalizados se representan mediante líneas discontinuas en los híbridos de resonancia, donde la letra griega δ se utiliza para indicar cargas negativas parciales en los átomos de oxígeno. La contribución del ion fosfato a la formación de un enlace éster (**b**) o anhídrido (**c**) desfavorece las posibilidades de deslocalización electrónica. Como resultado, el producto éster o anhídrido es un compuesto de mayor energía que el grupo fosfato y el alcohol o el ácido carboxílico requeridos para su formación. [El grupo fosfato (PO_4^{3-}) totalmente ionizado que se muestra en (b) y (c) se encuentra en equilibrio con el HPO_4^{2-} a pH 7].

más estable (de mínima energía) y se dice que está *estabilizada por resonancia.* Considere ahora lo que sucede si uno (o más) átomos de oxígeno del carboxilato o el grupo fosfato, totalmente ionizado, participa en un enlace covalente con un compuesto inorgánico: un átomo de oxígeno deja de estar disponible para la deslocalización electrónica de manera que el resto de los electrones están ahora deslocalizados sobre un número de oxígenos inferior al máximo lo que supone que la molécula se encuentra en una configuración de más alta energía (menos deslocalizada) (Figura 9.2b y c)(La letra griega δ [delta] se usa en híbridos de resonancia para indicar un cambio parcial en un átomo). Por ejemplo, en ADP + P_i hay ocho átomos de oxígeno que pueden compartir electrones extra, a diferencia de los siete del ATP (Figura 9.1).

En los ésteres sólo se libera una cantidad moderada de energía por hidrólisis mientras en los anhídridos la hidrólisis es altamente exergónica. Además de presentar una mayor estabilización por resonancia, los dos productos de la hidrólisis anhídrido están cargados y por lo tanto se repelen, lo que no sucede con la hidrólisis de los ésteres. En general los enlaces éster y fosfoéster tienen energías libres de hidrólisis de entre −3 y −4 kcal/mol, mientras que la hidrólisis de anhídridos y fosfoanhídridos libera cerca del doble de energía libre. La molécula de ATP ilustra bien esta diferencia. La hidrólisis de cualquiera de los grupos fosfoanhídrido que unen el segundo y tercer grupo fosfato al resto de la molécula presenta una diferencia de energía libre de alrededor de −7,3 kcal/mol mientras que la hidrólisis del enlace fosfoéster que une el primer fosfato a la ribosa tiene una $\Delta G^{o\prime}$ de alrededor de −3,6 kcal/mol:

$$\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{ADP} + \text{P}_i + \text{H}^+ \qquad \Delta G^{o\prime} = -7{,}3 \text{ kcal/mol} \qquad \textbf{(9.1)}$$

$$\text{ADP} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{AMP} + \text{P}_i + \text{H}^+ \qquad \Delta G^{o\prime} = -7{,}3 \text{ kcal/mol} \qquad \textbf{(9.2)}$$

$$\text{AMP} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{adenoise} + \text{P}_i \qquad \Delta G^{o\prime} = -3{,}6 \text{ kcal/mol} \qquad \textbf{(9.3)}$$

El ATP y ADP son, por tanto «compuestos de mayor energía» que el AMP, usando la terminología de los bioquímicos.

De hecho, es probable que el valor $\Delta G^{o\prime}$ de −7,3 kcal/mol no representa más que una fracción del cambio de energía libre asociado a la hidrólisis del ATP a ADP en las condiciones biológicas estándar. Como vimos en el Capítulo 5, el cambio real de energía libre, $\Delta G'$ depende de las concentraciones predominantes de reactivos y productos (*véase* Ecuación 5.21). La $\Delta G'$ para la hidrólisis del ATP (Reacción 9.1) se calcula como:

$$\Delta G' = \Delta G^{o\prime} + RT \ln \frac{[\text{ADP}]\,[\text{P}_i]}{[\text{ATP}]} \qquad \textbf{(9.4)}$$

En la mayoría de las células, la relación ATP/ADP es significativamente mayor que 1:1, normalmente en un rango de aproximadamente 5:1. Como resultado, el término ln([ADP][P_i]/[ATP] es negativo y por lo tanto $\Delta G'$ es más negativo que −7,3 kcal/mol, normalmente en el rango de −10 a −14 kcal/mol.

El ATP es un importante intermediario del metabolismo energético celular

El ATP ocupa una posición intermedia en el espectro global de compuestos fosforilados ricos en energía de la célula. Algunos de los intermediarios fosforilados más comunes del metabolismo celular se clasifican en función de sus valores de $\Delta G^{o\prime}$, como se muestra en la Tabla 9.1. Los valores son negativos de manera que los compuestos de la parte superior de la tabla liberan mayor energía por hidrólisis del grupo fosfato.

Tabla 9.1 Energía libre estándar de hidrólisis para compuestos fosforilados implicados en el metabolismo energético

Compuesto fosforilado y su reacción de hidrólisis	$\Delta G^{\circ\prime}$
Fosfoenol piruvato (PEP)	**(Kcal/mol)**
$+ H_2O \longrightarrow$ piruvato $+ P_i$	$-14{,}8$
1,3-difosfoglicerato	
$+ H_2O \longrightarrow$ 3-fosfoglicerato $+ P_i$	$-11{,}8$[1]
Fosfocreatina	
$+ H_2O \longrightarrow$ creatina $+ P_i$	$-10{,}3$
Adenosina trifosfato (ATP)	
$+ H_2O \longrightarrow$ adenosina difosfato $+ P_i$	$-7{,}3$
Glucosa-1-fosfato	
$+ H_2O \longrightarrow$ glucosa $+ P_i$	$-5{,}0$
Glucosa-6-fosfato	
$+ H_2O \longrightarrow$ glucosa $+ P_i$	$-3{,}3$
Glicerol fosfato	
$+ H_2O \longrightarrow$ glucosa $+ P_i$	$-2{,}2$

[1] El valor de $\Delta G^{\circ\prime}$ para el 1,3-difosfoglicerato es para la hidrólisis del enlace fosfoanhídrido en el carbono 1.

Esto supone que, en condiciones estándar, un compuesto puede fosforilar exergónicamente a cualquier compuesto de mayor $\Delta G^{\circ\prime}$ (es decir, con un valor $\Delta G^{\circ\prime}$ menos negativo) pero no a los compuestos situados por encima en la tabla. Así, se puede obtener ATP a partir de ADP por transferencia de un grupo fosfato del fosfoenolpiruvato (PEP), pero no a partir de la glucosa-6-fosfato, como se ilustra en la Figura 9.3. De la misma manera, el ATP puede fosforilar a la glucosa, pero no el piruvato. En otras palabras, las siguientes reacciones tienen valores de $\Delta G^{\circ\prime}$ negativos, que designaremos como $\Delta G^{\circ\prime}_{\text{de transferencia}}$ para resaltar que representan el cambio de energía libre estándar que implica la transferencia de un grupo fosfato de un donador a un aceptor. Los valores de $\Delta G^{\circ\prime}_{\text{de transferencia}}$ se pueden predecir a partir de los valores de la Tabla 9.1 y calcularse como:

$$\text{Glucosa} + \text{ATP} \longrightarrow \text{glucosa-6-fosfato} + \text{ADP} + H^+$$
$$\Delta G^{\circ\prime}_{\text{de transferencia}} = \Delta G^{\circ\prime}_{\text{donador}} - \Delta G^{\circ\prime}_{\text{aceptor}} = -7{,}3 - (-3{,}3) = -4{,}0 \text{ kcal/mol} \qquad \textbf{(9.5)}$$

$$\text{PEP} + \text{ADP} + H^+ \longrightarrow \text{piruvato} + \text{ATP}$$
$$\Delta G^{\circ\prime}_{\text{de transferencia}} = -14{,}8 - (-7{,}3) = -7{,}5 \text{ kcal/mol} \qquad \textbf{(9.6)}$$

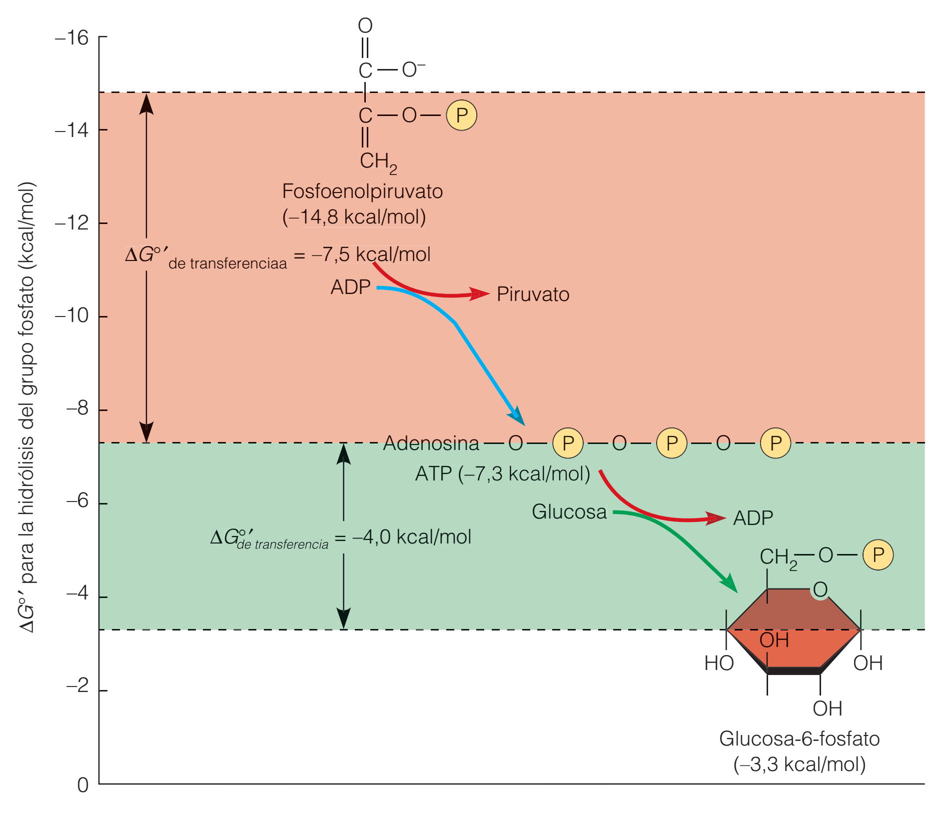
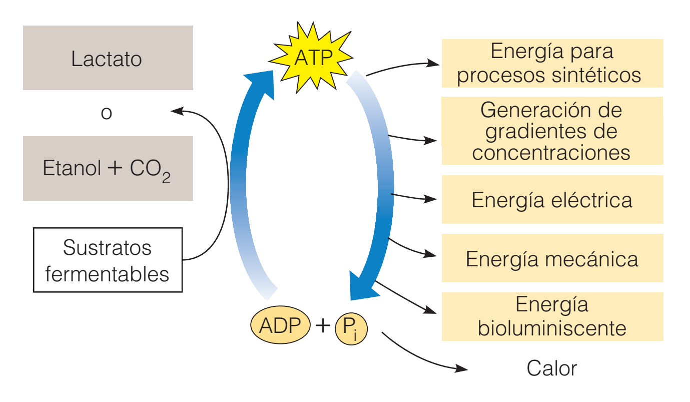
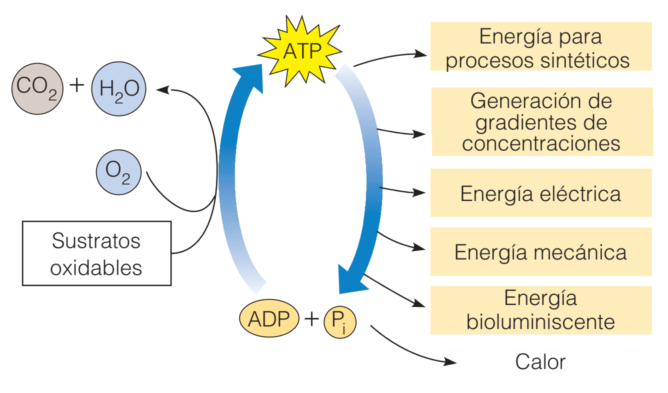


Figura 9.3 Ejemplos de transferencia exergónica de grupos fosfato. Estos ejemplos están basados los valores de $\Delta G^{\circ\prime}$ mostrados en la Tabla 9.1. Para la hidrólisis de grupos fosfato, el fosfoenolpiruvato (PEP; $-14{,}8$ kcal/mol) se considera un compuesto de alta energía, el ATP ($-7{,}3$ kcal/mol) un compuesto de energía intermedia y la glucosa-6-fosfato ($-3{,}3$ kcal/mol) un compuesto de baja energía. Así, el PEP puede transferir su grupo fosfato exergónicamente al ADP para formar ATP [$\Delta G^{\circ\prime}_{\text{de transferencia}} = \Delta G^{\circ\prime}_{\text{donador}} - \Delta G^{\circ\prime}_{\text{aceptor}} = -14{,}8 - (-7{,}3) = -7{,}5$ kcal/mol] y el ATP puede fosforilar glucosa exergónicamente [$\Delta G^{\circ\prime}_{\text{de transferencia}} = -7{,}3 - (-3{,}3) = -4{,}0$ kcal/mol] pero la reacción reversible no puede darse en condiciones estándar. De hecho, el valor de $\Delta G^{\circ\prime}$ en estas reacciones de transferencia es tan negativo, que ambas reacciones son irreversibles en todas las condiciones celulares.



(a) Condiciones anaerobias



(b) Condiciones aerobias

Figura 9.4 El sistema ATP/ADP como modo de conservar y liberar energía en la célula. El ATP generado durante el catabolismo oxidativo de nutrientes (lado izquierdo) se utiliza para distintas funciones celulares (lado derecho). (**a**) En condiciones anaeróbicas o de hipoxia (pobres en oxígeno), se genera ATP por fermentación, con el lactato como producto final más comun en algunos organismos, y el etanol y dióxido de carbono como productos finales en otros organismos. (**b**) En condiciones aeróbicas, el ATP se genera por respiración, en la que los nutrientes oxidables se catabolizan completamente hasta dar lugar a dióxido de carbono y agua.

Como veremos en breve, las Reacciones 9.5 y 9.6 son los pasos primero y último, respectivamente, en una importante secuencia catabólica denominada *ruta glucolítica,* que es el punto de partida del metabolismo energético quimiotrofo en prácticamente todas las formas de vida.

Las Reacciones 9.5 y 9.6, que implican el movimiento de un grupo químico de una molécula a otra, se denominan **reacciones de transferencia de grupo**. Estas reacciones representan uno de los procesos más comunes del metabolismo celular y el grupo fosfato es uno de los que se transfieren con más frecuencia, especialmente en el metabolismo energético.

El dato más importante que debemos recordar de la Tabla 9.1 y de la Figura 9.3 es que el par ATP/ADP ocupa una posición *intermedia* crucial en términos de energía de enlace. Esto significa que el ATP puede funcionar como *donador* de fosfato en algunas reacciones biológicas y su forma defosforilada, el ADP, puede ser *aceptor* de fosfato en otras reacciones, ya que hay compuestos tanto de mayor como de menor energía que el par ATP/ADP.

En resumen, el par ATP/ADP representa una forma reversible de conservar, transferir y liberar energía dentro de la célula (Figura 9.4). Como los procesos catabólicos tienen lugar en la célula, tanto anaeróbica (Figura 9.4a), como aeróbicamente (Figura 9.4b), las reacciones que liberan energía están acopladas al sistema ATP/ADP, de modo que la energía libre disponible hace posible la síntesis de ATP a partir de ADP. La energía libre liberada por la hidrólisis de ATP, puede ser utilizada en muchos procesos esenciales para la vida (como la biosíntesis, el transporte activo, la separación de cargas y la contracción muscular) que requieren un aporte energético.

Metabolismo energético quimiótrofo

Ya tenemos los conceptos fundamentales para abordar el tema principal de este capítulo y el siguiente. En otras palabras, estamos preparados para analizar el **metabolismo energético quimiótrofo** —las rutas y reacciones mediante las cuales las células catabolizan nutrientes y conservan, en forma de ATP, parte de la energía libre que se libera en ellas—. O, para personalizarlo, examinaremos los procesos metabólicos concretos por los que las células de su cuerpo utilizan los alimentos que usted toma para satisfacer sus necesidades energéticas. Empezaremos el análisis considerando la *oxidación* ya que la mayoría de las reacciones del metabolismo energético quimiótrofo implican reacciones oxidativas que producen energía.

Las oxidaciones biológicas normalmente implican la eliminación de electrones y protones y son altamente exergónicas

Decir que los nutrientes como los carbohidratos, grasas o proteínas son fuente de energía para la célula significa que son compuestos orgánicos oxidables y que su oxidación es altamente exergónica. Recordamos de química que la **oxidación** es la pérdida de electrones. Así, por ejemplo, el ion ferroso (Fe^{2+}) es oxidable porque puede ceder un electrón convirtiéndose en ion férrico (Fe^{3+}):

$$Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+} + e^- \quad \textbf{(9.7)}$$

La única diferencia en la química biológica es que la oxidación de moléculas orgánicas normalmente implica la eliminación, no sólo de electrones, sino también de iones hidrógeno (protones), de manera que el proceso es también una **deshidrogenación**. Por ejemplo, consi-

deremos la oxidación del etanol al correspondiente aldehído:

$$\underset{\text{Etanol}}{CH_3{-}CH_2{-}OH} \xrightarrow{\text{oxidación}} \underset{\text{Acetaldehído}}{CH_3{-}\overset{\overset{\displaystyle H}{|}}{C}{=}O} + 2e^- + 2H^+ \quad \textbf{(9.8)}$$

Esto es claramente una oxidación, ya que se eliminan electrones. Pero se liberan también protones, y un electrón más un protón es equivalente a un átomo de hidrógeno. De esta manera, lo que tiene lugar es, a todos los efectos, la eliminación del equivalente a dos átomos de hidrógeno:

$$\underset{\text{Etanol}}{CH_3{-}CH_2{-}OH} \xrightarrow[\text{(deshidrogenación)}]{\text{oxidación}} \underset{\text{Acetaldehído}}{CH_3{-}\overset{\overset{\displaystyle H}{|}}{C}{=}O} + [2H] \quad \textbf{(9.9)}$$

Así, en las reacciones celulares en las que participan moléculas orgánicas, tiene lugar casi siempre como una reacción de deshidrogenación. De hecho, la mayoría de las enzimas que catalizan reacciones oxidativas en las células son ***deshidrogenasas.*** (Los corchetes alrededor de los átomos de hidrógeno en ésta y las siguientes reacciones son para recordar que los átomos de hidrógeno no se liberan o toman como tales. Son liberados o tomados por transportadores denominados coenzimas, como veremos en breve.)

Ninguna de las reacciones de oxidación anteriores puede tener lugar de forma aislada; los electrones se transfieren a otra molécula, que queda *reducida* en el proceso. La **reducción** es lo opuesto a la oxidación y se define como la ganancia de electrones. En las reducciones biológicas, como en las oxidaciones, los electrones suelen ir acompañados de protones y la reacción global es, por tanto, una **hidrogenación**:

$$\underset{\text{Acetaldehído}}{CH_3{-}\overset{\overset{\displaystyle H}{|}}{C}{=}O} + [2H] \xrightarrow[\text{(hidrogenación)}]{\text{(reducción)}} \underset{\text{Etanol}}{CH_3{-}CH_2{-}OH} \quad \textbf{(9.10)}$$

Las Reacciones 9.9 y 9.10 también ilustran la característica principal de las reacciones de oxidación-reducción, que casi siempre implican la transferencia de un *par de electrones* (y por tanto, un par de protones).

Tal y como están formuladas, las Reacciones 9.9 y 9.10 son sólo *media reacción*, que representan un proceso de oxidación y uno de reducción respectivamente. En las reacciones reales, sin embargo, *las oxidaciones y las reducciones tienen lugar simultáneamente.* Cada vez que tiene lugar una oxidación, tiene que darse también una reducción, porque los electrones (y los protones) eliminados de una molécula, deben añadirse a otra. Por otro lado, a pesar de como están escritas las Reacciones 9.9 y 9.10, los átomos de hidrógeno nunca se liberan realmente en la solución sino que se transfieren de una molécula a otra.

Las coenzimas como el NAD^+ funcionan como aceptores de electrones en las oxidaciones biológicas

En el metabolismo quimiótrofo de la energía el último aceptor de electrones es normalmente, aunque no siempre, el oxígeno. (Veremos algunos aceptores alternativos de energía en el Capítulo 10, como el H^+ y el S; aquí consideraremos el oxígeno como el aceptor de electrones estándar.) *Sin embargo, en algunos casos excepcionales los electrones pasan directamente de un sustrato oxidable al oxígeno.* En la mayoría de las oxidaciones biológicas el aceptor inmediato de electrones (y el donador inmediato de electrones en la mayoría de las reducciones) es alguna **coenzima**. En general, las coenzimas son moléculas pequeñas que funcionan junto con las enzimas (de ahí su nombre), como transportadores de electrones o de pequeños grupos funcionales. Como veremos en breve, las coenzimas funcionan realmente como sustratos en las reacciones en las que participan. Sin embargo, no son consumidas, sino recicladas dentro de la célula de manera que aunque se encuentran a concentraciones relativamente bajas éstas son suficientes para las necesidades celulares.

La coenzima más común implicada en el metabolismo energético es la **nicotinamida adenina dinucleótido** (NAD^+). Su estructura se muestra en la Figura 9.5. A pesar de su complicado nombre y estructura su función es muy sencilla: el NAD^+ sirve como aceptor de un electrón por incorporación, a su anillo aromático, de dos electrones y un protón, generando así la forma reducida, el NADPH y un protón:

$$\underset{\text{(oxidado)}}{NAD^+} + 2[H] \longrightarrow \underset{\text{(reducido)}}{NADH + H^+} \quad \textbf{(9.11)}$$

Como apunte nutricional, la nicotinamida del NAD^+ es un derivado de la *niacina,* conocida como *vitamina B* —de la familia de los compuestos solubles en agua esenciales en la dieta del hombre y otros vertebrados incapaces de sintetizar este tipo de compuestos—. En el Capítulo 10, veremos al FAD y a la CoA, otras dos coenzimas que tienen también derivados de la vitamina B en sus estructuras. Precisamente, por ser componentes de coenzimas imprescindibles, estas vitaminas, que se requieren en cantidades mínimas (catabólicas), son esenciales en la dieta de aquellos organismos incapaces de producirlas.

La mayoría de los quimiótrofos consiguen la energía necesaria por oxidación de las moléculas orgánicas de los alimentos

Nos interesamos por la oxidación porque es el modo mediante el que los quimiotrofos, entre ellos los humanos, conseguimos la mayor parte de la energía que necesitamos.

Figura 9.5 La estructura del NAD$^+$ y su oxidación y reducción. La parte de la estructura recuadrada en rojo es la nicotinamida, una vitamina B. Los átomos de hidrógeno derivados de un sustrato oxidable se muestran en azul. Cuando el NAD$^+$ se usa como aceptor de electrones, dos electrones y un protón del sustrato oxidable se transfieren a uno de los átomos de carbono de la nicotinamida y el otro protón se libera en la solución. El NAD$^+$ suele funcionar como aceptor de electrones en la oxidación de los enlaces C-C (carbono-carbono). En el NADP$^+$, una coenzima relacionada que veremos en el Capítulo 11, el grupo hidroxilo marcado es sustituido por un grupo fosfato.

Hay muchas sustancias distintas que sirven como sustratos en las oxidaciones biológicas. Por ejemplo, algunos microorganismos pueden usar compuestos inorgánicos, tales como formas reducidas del hierro, azufre o nitrógeno, como fuente de energía. Estos organismos llevan a cabo reacciones oxidativas muy especializadas y tienen un papel fundamental en la economía inorgánica de la biosfera. Nosotros y la mayoría de los quimiótrofos, sin embargo, dependemos de las moléculas orgánicas de los alimentos como sustratos oxidables, fundamentalmente carbohidratos, grasas y proteínas.

La glucosa es uno de los sustratos oxidables más importantes del metabolismo energético

Para simplificar nuestra exposición y unificar los conceptos metabólicos, nos centraremos en la oxidación biológica de la **glucosa,** un azúcar de seis carbonos ($C_6H_{12}O_6$). La glucosa es un buen candidato por varios motivos. En la mayoría de los vertebrados, incluyendo al hombre, la glucosa es el azúcar mayoritario en la sangre, y por lo tanto la principal fuente de energía para las células del cuerpo. La glucosa de la sangre procede, mayoritariamente, de carbohidratos ingeridos, como la sacarosa o el almidón o de la degradación del glucógeno, un polímero de la glucosa. Por tanto, la glucosa es una molécula especialmente importante para usted. Como veremos más adelante en el Apéndice 9A, la glucosa también es muy importante para las plantas, ya que es el monosacárido liberado por degradación del almidón. Además, la glucosa forma la mitad de la molécula del disacárido sacarosa, el azúcar mayoritario del sistema vascular de la mayor parte de las plantas. Es más, el catabolismo de la mayoría de otras sustancias altamente energéticas en plantas, animales y microorganismos, comienza por su conversión en uno de los intermediarios de la ruta catabólica de la glucosa. Por lo tanto, no nos estamos centrando sólo en un compuesto sencillo, sino que estamos considerando una ruta metabólica que es fundamental en el metabolismo quimiótrofo de la energía.

Químicamente, la glucosa es una *aldohexosa,* un azúcar de seis carbonos que tiene un grupo carbonilo terminal, cuando la molécula se representa como cadena desplegada. Recordemos del Capítulo 3 que la molécula de glucosa se puede representar por cualquiera de las tres estructuras mostradas en la Figura 3.21. La *proyección de Haworth* es la más satisfactoria de las tres, porque muestra la forma cíclica y la relación espacial de los átomos de carbono. Sin embargo, nosotros usaremos la *proyección de Fischer* de cadena desplegada, porque la química de los pasos iniciales del catabolismo de la glucosa es más fácil de entender utilizando este modelo.

La oxidación de la glucosa es altamente exergónica

La glucosa es una buena fuente potencial de energía porque su oxidación es un proceso altamente exergónico, con un valor de $\Delta G^{\circ\prime}$ de -686 kcal/mol, en la combustión completa de la glucosa a dióxido de carbono y agua:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O \qquad \textbf{(9.12)}$$

Como parámetro termodinámico, el valor de $\Delta G^{\circ\prime}$ no se ve afectado por la ruta y tendrá el mismo valor si la oxidación se da directamente por combustión, con toda la energía liberada en forma de calor, o por oxidación biológica, en la que parte de la energía se conserva como ATP. Así, la oxidación de las moléculas de azúcar del algodón de azúcar liberarán la misma cantidad de energía libre si se que-

man al fuego o si se ingieren y catabolizan por el cuerpo cuerpo. Sin embargo, biológicamente la distinción es fundamental: *una combustión incontrolada ocurre a temperaturas que son incompatibles con la vida y la mayor parte de la energía libre se libera en forma de calor. Las oxidaciones biológicas implican reacciones catalizadas enzimáticamente, que tienen lugar sin cambios significativos de temperatura, conservándose químicamente la energía libre, en forma de ATP.*

En este capítulo y el siguiente, consideraremos los procesos biológicos en los que la energía de los enlaces oxidables se libera en condiciones compatibles con la vida y de manera que se asegure la conservación de la mayor energía posible en forma de ATP. También veremos el modo por el que las células ajustan constantemente la velocidad de oxidación y de síntesis, para responder a las necesidades celulares de ATP.

El catabolismo de la glucosa produce mucha más energía en presencia que en ausencia de oxígeno

Al hablar de la glucosa (o de cualquier otro compuesto) como un *sustrato oxidable* se asume la disponibilidad de algún tipo de aceptor de electrones, sin el cual no es posible la oxidación. Como vimos antes, el aceptor de electrones en la mayoría de los organismos es el oxígeno molecular (O_2). Por ejemplo, la Reacción 9.12 asume la disponibilidad de oxígeno. En la mayor parte de los organismos, obtener las 686 kcal/mol de energía libre de la glucosa sólo es posible cuando el oxígeno es el aceptor final de electrones y por lo tanto requiere condiciones aerobias. La oxidación completa de la glucosa en dióxido de carbono y agua, en presencia de oxígeno, se denomina respiración aerobia. En el Capítulo 10, veremos la **respiración aerobia,** o *respiración* para abreviar, un proceso complejo y de múltiples pasos. Aprenderemos también que algunos organismos, normalmente bacterias, pueden llevar a cabo la **respiración anaerobia**, usando un aceptor final de electrones distinto del oxígeno.

Incluso en ausencia o escasez de oxígeno, la mayor parte de los organismos pueden extraer cantidades limitadas de energía de la glucosa y sustratos relacionados, pero sin una oxidación completa y con rendimientos energéticos mucho menores. Lo consiguen mediante la *glucolisis,* una ruta que no requiere oxígeno. En este proceso, uno de los intermediarios de la ruta pierde electrones pero más tarde otro intermediario de la misma ruta los recupera. Este proceso anaeróbico se denomina **fermentación** y se identifica en base a su producto final principal. En algunas células animales y en muchas bacterias, el producto final es el lactato de manera que el proceso del catabolismo anaerobio de la glucosa se denomina *fermentación láctica.* En la mayoría de las células vegetales y en microorganismos como las levaduras, el proceso se denomina *fermentación alcohólica* porque el producto final es el etanol, un alcohol.

Basándose en sus requerimientos de oxígeno, los organismos son aeróbicos, anaeróbicos o facultativos

Los organismos se pueden clasificar en función a sus requerimientos de oxígeno y a su utilización como aceptor de electrones en el metabolismo energético. La mayoría de los organismos tienen una necesidad absoluta de oxígeno y se denominan **aerobios estrictos**. Puede ver uno de estos organismos cada día en el espejo. Los organismos **anaerobios estrictos**, por otro lado, no pueden usar oxígeno como aceptor final de electrones bajo ninguna condición. De hecho, el oxígeno es tóxico para estos organismos. Por lo tanto, no es sorprendente que se encuentren en ambientes carentes de oxígeno, como en heridas profundas o en las profundidades de un estanque. Los anaerobios más estrictos son las bacterias, incluyendo a los agentes causales de la gangrena, de las intoxicaciones alimentarias y de la producción de metano.

Los **organismos facultativos** pueden desarrollarse tanto en condiciones aerobias como anaerobias. En condiciones de disponibilidad de oxígeno la mayor parte de los facultativos llevan a cabo la respiración aerobia. Sin embargo, pueden cambiar al modo fermentativo en cantidades limitantes o nulas de oxígeno. Muchas bacterias y hongos, así como moluscos y anélidos (gusanos) son organismos facultativos. Algunas células o tejidos de organismos aerobios también pueden, en ausencia o con escasez temporal de oxígeno, funcionar como facultativos si es necesario. Por ejemplo, las células del músculo esquelético; normalmente funcionan aeróbicamente, pero pueden llevar a cabo la fermentación láctica mientras la cantidad de oxígeno sea limitante, por ejemplo, durante periodos de ejercicio prolongado o muy intenso.

Dedicaremos el resto del capítulo a la generación anaeróbica del ATP por medio de la fermentación de la glucosa. Por tanto, nos centraremos en el metabolismo aeróbico en el próximo capítulo. Vamos a considerar primero los procesos de fermentación, ya que la ruta glucolítica es común a los procesos de fermentación y respiración aerobia. Empezando por la fermentación, veremos las formas de extraer energía de la glucosa sin oxidación total e introduciremos los procesos aeróbicos del próximo capítulo.

Glucolisis y fermentación: producción de ATP en ausencia de oxígeno

Tanto los anaerobios estrictos como los facultativos, que obtienen energía por fermentación, llevan a cabo reacciones oxidativas que producen energía en las que el oxígeno no es el aceptor final de electrones. La molécula de glucosa se degrada dando lugar a 2 moléculas de tres átomos de carbono, cada una de las cuales es parcialmente oxidada por una secuencia de reacciones que es suficientemente

exergónica para generar 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa fermentada. En la mayoría de las células, ésta es la máxima cantidad de energía que pueden obtener en ausencia de oxígeno o de un aceptor de electrones alternativo. Sin embargo, hay excepciones. Algunos microorganismos pueden obtener más de 5 moléculas de ATP por glucosa, mediante sistemas enzimáticos especializados. Además, algunas plantas y animales adaptados a la anoxia (falta de oxígeno) pueden obtener más de 2 moléculas de ATP por glucosa.

La glucolisis genera ATP por catálisis de la glucosa a piruvato

El proceso de **glucolisis**, también llamado **ruta glucolítica**, es una secuencia de reacciones de diez pasos que convierte una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato, un compuesto tricarbonado (Figura 9.6). La glucolisis es común a los metabolismos aerobio y anaerobio. Históricamente, la ruta glucolítica ha sido considerada la principal ruta metabólica a describir. El trabajo decisivo para su descripción lo llevaron a cabo, en 1930, los bioquímicos alemanes Gustav Embden, Otto Meyerhof y Otto Warburg. De hecho, un nombre alternativo de la ruta glucolítica es el de *ruta Embden-Meyerhof*.

Visión general de la glucolisis. La ruta glucolítica se representa en el contexto de la fermentación en la Figura 9.6 y aparece también como componente de la respiración aerobia en el siguiente capítulo (*véase* Figura 10.1). Las diez reacciones de la ruta están numeradas en la secuencia (Gly-1 a Gly-10) y las enzimas que catalizan estas reacciones se identifican en el recuadro central. La esencia del proceso está sugerida en el nombre, ya que el término *glucolisis* deriva dos raíces griegas: *glykos*, que significa «dulce», y *lysis*, que significa «aflojarse» o «separarse». La separación se da en la reacción Gly-4 de la Figura 9.6, cuando el azúcar de seis carbonos se escinde en dos moléculas de tres átomos de carbono. Una de estas moléculas, el gliceraldehído-3-fosfato, es la única molécula que se oxida en esta ruta.

Algunas características importantes de la ruta son la reacción de ruptura del azúcar que da nombre a la secuencia (Gly-4), la oxidación, que genera NADH (Gly-6) y los dos pasos específicos en que esta secuencia de reacciones se acopla a la generación de ATP (Gly-7 y Gly-10). Volveremos a hacer hincapié en estas características cuando consideremos la ruta general en tres fases: los pasos de preparación y ruptura (Gly-1 a Gly-5); la secuencia oxidativa, que también genera ATP (Gly-6 a Gly-7); y la segunda reacción de síntesis de ATP (Gly-8 a Gly-10).

Fase 1: Preparación y ruptura. Para empezar a estudiar la glucolisis, adviértase de que el resultado neto de las tres primeras reacciones es la conversión de una molécula no fosforilada (glucosa) en una molécula doblemente fosforilada (*fructosa-1, 6-bifosfato*). Esto requiere la adición de dos grupos fosfato a la glucosa, uno en cada carbono terminal. Observando la glucosa, es fácil ver cómo puede tener lugar la fosforilación del carbono 6 en la reacción Gly-1, porque el grupo hidroxilo puede unirse directamente al grupo fosfato para dar glucosa-6-fosfato. El ATP proporciona, no sólo el grupo fosfato, sino la energía que resulta del proceso de fosforilación, que es altamente exergónico ($\Delta G^{\circ\prime} = -4{,}0$ kcal/mol), haciendo el proceso esencialmente irreversible en la dirección de la fosforilación de la glucosa. El enlace formado por la fosforilación de la glucosa es un *enlace fosfoéster*, mientras el enlace por el que el fosfato terminal se une al ATP es un *enlace fosfoanhídrido*. Esta diferencia es la que hace que la transferencia del grupo fosfato del ATP a la glucosa sea altamente exergónica (*véanse* Reacción 9.5 y Figura 9.3). La enzima que cataliza esta primera reacción se denomina *hexoquinasa*; como su nombre sugiere, no es específica de la glucosa sino que cataliza la fosforilación de otras hexosas (azúcares de seis carbonos). (Las células hepáticas tienen una enzima adicional, la *glucoquinasa*, que sólo fosforila glucosa.)

El grupo carbonilo del carbono 1 de la glucosa no es tan fácilmente fosforilable como el grupo hidroxilo del carbono 6. Sin embargo, en la siguiente reacción (Gly-2), el aldoazúcar glucosa-6-fosfato se convierte en el correspondiente cetoazúcar, fructosa-6-fosfato, que tiene un grupo hidroxilo en el carbono 1. Este grupo hidroxilo puede ser luego fosforilado, dando lugar a un azúcar doblemente fosforilado, fructosa-1,6-difosfato (reacción Gly-3). De nuevo, la diferencia de energía entre el enlace anhídrido del ATP y el enlace fosfoéster de la molécula de fructosa supone una reacción altamente exergónica y por lo tanto irreversible en la dirección glucolítica ($\Delta G^{\circ\prime} = -3{,}4$ kcal/mol). Esta reacción está catalizada por la *fosfofructoquinasa-1 (PFK-1)*, una enzima de especial importancia en la regulación de la glucolisis, como veremos más adelante. Se designa PFK-1 para distinguir esta enzima de la PFK-2, una enzima similar implicada en regulación (*véase* Figura 9.13).

El siguiente paso es la reacción de ruptura real, de la que deriva el nombre de glucolisis. La enzima *aldolasa*, rompe la fructosa-1,6-difosfato dando lugar a dos triosas (azúcares de tres átomos de carbono), llamadas dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído-3-fosfato (reacción Gly-4), que son interconvertibles (Gly-5). Ya que sólo el último de estos compuestos es oxidable directamente en la siguiente fase de la glucolisis, la conversión de las dos triosas permite que la dihidroxiacetona fosfato sea catabolizada por simple conversión a gliceraldehído-3-fosfato.

Podemos resumir esta primera fase de la ruta glucolítica (Gly-1 a Gly-5) como sigue:

$$\text{Glucosa} + 2\text{ATP} \longrightarrow 2\text{-gliceraldehído-3-fosfato} + 2\text{ADP} \quad \mathbf{(9.13)}$$

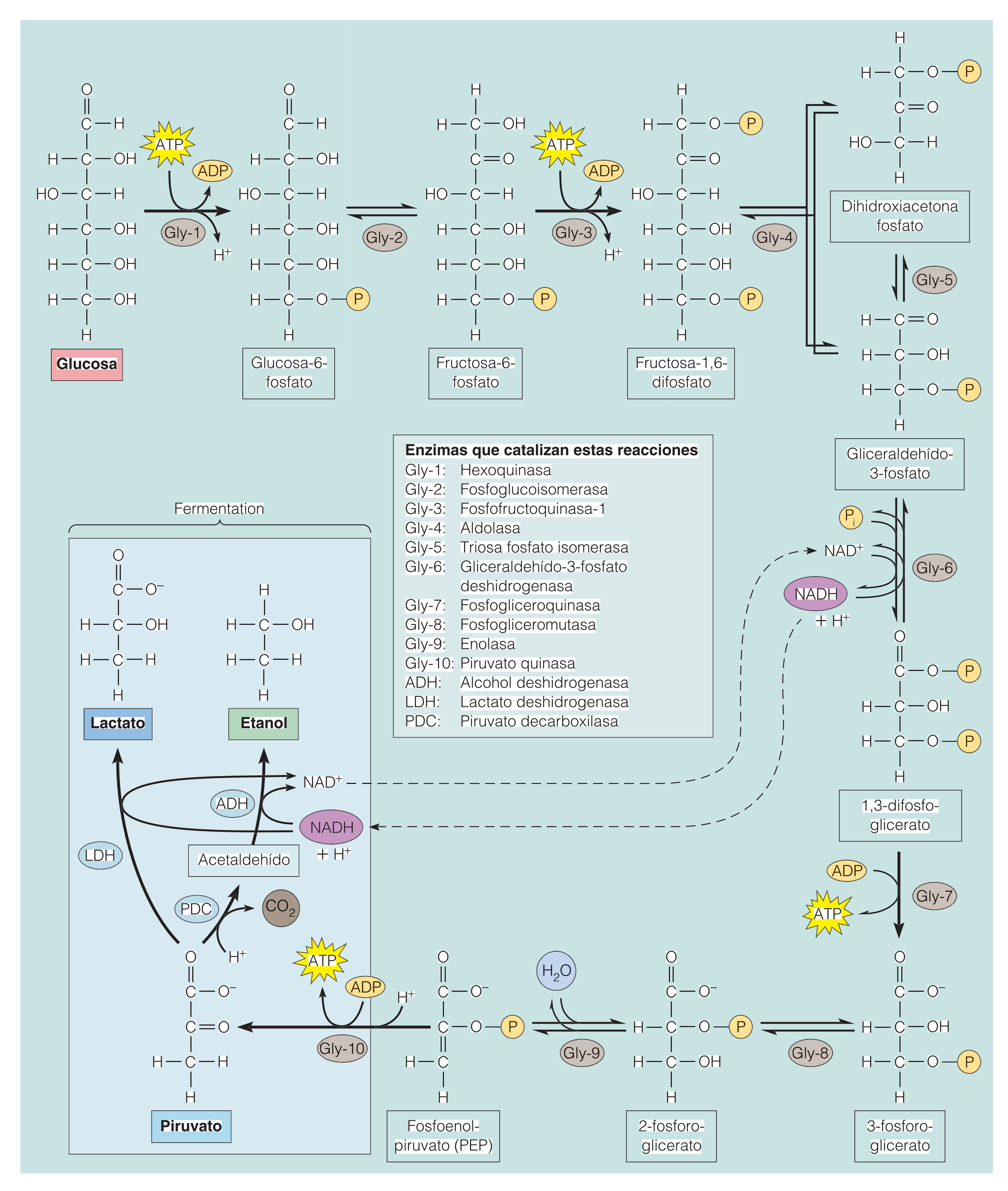


Figura 9.6 **La ruta glucolítica de glucosa a piruvato, con dos alternativas de ruta fermentativa.** La glucolisis es una secuencia de diez reacciones en las que la glucosa (o azúcares relacionados) es catabolizada a piruvato, en una sencilla reacción de oxidación (Gly-6) y dos pasos en los que se genera ATP (Gly-7 y Gly-10). En ausencia de oxígeno o de otro aceptor de electrones, el NADH generado por la reacción Gly-6 se reoxida durante la fermentación por transferencia de sus electrones al piruvato. Los productos más comunes de la fermentación de la glucosa son el lactato o el etanol y el dióxido de carbono. Las enzimas que catalizan estas reacciones se muestran en el recuadro central. En la mayoría de las células, estas enzimas se encuentran en el citosol. En unos protozoos parásitos denominados tripanosomas, sin embargo, las primeras siete enzimas están compartimentalizadas en orgánulos unidos a la membrana, denominados *glicosomas*.

Observe que en ésta y en las siguientes reacciones, los iones H^+ y las moléculas de H_2O no se incluyen si no es necesario para comprender la reacción global.

Fase 2: Oxidación y síntesis de ATP. Hasta ahora, la molécula de glucosa inicial ha sido doblemente fosforilada y escindida en dos triosas fosfato interconvertibles. Sin embargo, el rendimiento energético es negativo: en la fase 1 se han *consumido* dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa. Pero este débito de ATP va a ser pagado con intereses cuando lleguemos a las dos fases de la glucolisis en las que se produce energía. En la fase 2 (reacciones Gly-6 y Gly-7), la producción de ATP está acoplada directamente a una oxidación, y mas tarde, en la fase 3 (Gly-8 a Gly-10), una forma fosforilada del piruvato, de alta energía, sirve para la producción de ATP.

La oxidación del gliceraldehído-3-fosfato al correspondiente ácido 3-fosfoglicerato, es altamente exergónica, de hecho, es suficiente para llevar a cabo la reducción de la coenzima NAD^+ (Gly-6) y la fosforilación del ADP con fosfato inorgánico, P_i (Gly-7). Históricamente, éste fue el primer ejemplo caracterizado de una secuencia de reacciones en las que la generación de ATP está acoplada a un proceso oxidativo.

Las características más importantes de esta secuencia de reacciones altamente exergónicas son la participación del NAD^+ como aceptor de electrones y el acoplamiento de la oxidación a la formación de un intermediario, doblemente fosforilado, de alta energía, el 1,3-difosfoglicerato. El enlace fosfoanhidro del átomo de carbono 1 de este intermediario tiene tan alta $\Delta G°'$ de hidrólisis (−11,8 kcal/mol; *véase* Tabla 9.1) que la transferencia del fosfato del ADP, catalizada por la enzima fosfoglicerato quinasa, es una reacción muy exergónica e irreversible. La producción de ATP, por la transferencia directa al ADP, de un grupo fosfato de alta energía procedente de un sustrato fosforilado como el 1,3-difosfoglicerato se denomina **fosforilación a nivel de sustrato.** Esta forma de síntesis de ATP es distinta de la *fosforilación oxidativa*, en la que la fosforilación del ADP se debe a la transferencia exergónica de electrones desde coenzimas reducidas al oxígeno, como veremos en el Capítulo 10.

Para resumir la fosforilación a nivel de sustrato de las reacciones Gly-6 y Gly-7, podemos escribir una reacción global, que cuenta una de las dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato por cada molécula de glucosa en la primera fase de la glucolisis:

$$\text{Gliceraldehído-3-fosfato} + NAD^+ + ADP + P_i \longrightarrow \text{3-fosfoglicerato} + NADH + H^+ + ATP \quad \textbf{(9.14)}$$

Recordemos que cada reacción de la ruta glucolítica más allá del gliceraldehído-3-fosfato, ocurre dos veces por cada molécula de glucosa inicial, de manera que, por cada molécula de glucosa, deben ser reoxidadas dos moléculas de NADH, para generar el NAD^+ necesario en la oxidación del gliceraldehído-3-fosfato. Esto significa también que la inversión inicial de dos moléculas de ATP en la fase 1 se recupera aquí en la fase 2, de manera que el rendimiento neto de ATP en este punto es cero.

Más adelante, en la fase final de la glucolisis, veremos la generación de dos moléculas más de ATP. Así, en la glucolisis como proceso global, hay una ganancia neta de dos moléculas de ATP por cada glucosa metabolizada a piruvato.

Fase 3: Formación de piruvato y generación de ATP. La formación de otra molécula de ATP a partir del 3-fosfoglicerato depende del grupo fosfato del carbono 3. En este estado, el grupo fosfato está unido al átomo de carbono por un enlace fosfoéster de baja energía libre de hidrólisis ($\Delta G°' =$ −3,3 kcal/mol). En la fase final de la vía glucolítica, este enlace fosfoéster se convierte en un *enlace fosfoenol*, cuya hidrólisis es muy exergónica ($\Delta G°' = -14{,}8$ kcal/mol; *véase* Tabla 9.1). Este incremento en la cantidad de energía libre liberada por hidrólisis implica un reordenamiento de la energía interna de la molécula. Para llevarlo a cabo, el grupo fosfato del 3-fosfoglicerato se traslada al átomo de carbono adyacente, formando el 2-fosfoglicerato (reacción Gly-8). A continuación la enzima enolasa (reacción Gly-9) elimina una molécula de agua del 2-fosfoglicerato generando fosfoenolpiruvato (PEP), un compuesto de alta energía.

Si nos fijamos cuidadosamente en la estructura del PEP (*véase* Figura 9.6, reacción Gly-9) se aprecia que, a diferencia de los enlaces fosfoéster del 2- y 3-fosfoglicerato, el enlace fosfoenol del PEP tiene lo que podríamos definir como la característica fundamental de un enlace fosfato de alta energía: *un grupo fosfato en un átomo de carbono que está unido por un doble enlace a otro átomo, casi siempre de carbono u oxígeno*. De hecho, la hidrólisis del enlace fosfoenol del PEP es una de las reacciones hidrolíticas más exergónicas conocida de los sistemas biológicos.

Para comprender por qué el PEP es un compuesto de mayor energía que otros intermediarios fosforilados de la célula, observemos la Figura 9.7. Como la mayoría de los ceto-compuestos, el piruvato puede encontrarse en dos formas interconvertibles, denominadas formas *enol* y *ceto*. Estas dos formas se diferencian sólo en la localización del doble enlace (Figura 9.7a). Sin embargo, el equilibrio de conversión favorece claramente la forma ceto. De hecho, la $\Delta G°'$ de la conversión enol a ceto es altamente exergónica (alrededor de −10 kcal/mol). Esto explica cómo la hidrólisis del PEP permite la síntesis de ATP en la reacción Gly-10, que implica la transferencia de su fosfato al ADP, dando lugar a otra molécula de ATP. Así, esta transferencia, catalizada por la enzima *piruvato quinasa*, es altamente exergónica ($\Delta G°' = -7{,}5$ kcal/mol; *véanse* Figura 9.3 y Reacción 9.6) y es, por tanto, esencialmente irreversible en la dirección de la formación de piruvato y ATP.

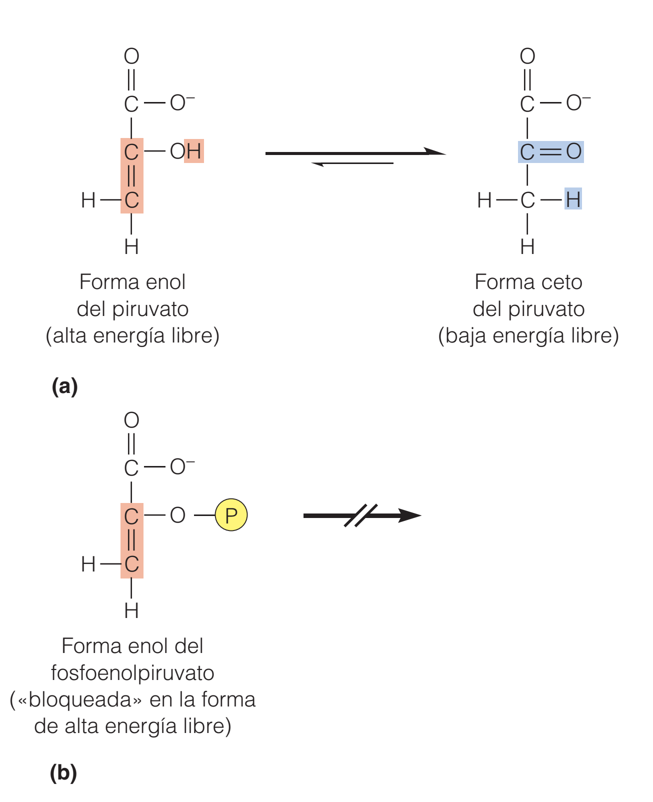


Figura 9.7 La inestabilidad termodinámica del fosfoenolpiruvato. (**a**) Como compuesto ceto, el piruvato puede encontrarse como forma ceto o enol, pero el equilibrio favorece claramente a la forma ceto. La conversión de la forma enol a la forma ceto es, por tanto, termodinámicamente muy favorable. (**b**) Fosfoenolpiruvato, que es la forma generada en la reacción Gly-9 está en la configuración enol termodinámicamente desfavorable pero no puede convertirse en la forma ceto, más estable, debido al grupo fosfato, covalentemente unido al átomo de carbono 2. (Las dos líneas diagonales que atraviesan las flechas indican que la reacción no puede darse.) La liberación de este grupo fosfato es muy exergónica, porque después la molécula de piruvato puede asumir la forma ceto de baja energía libre.

Para resumir la tercera fase de la glucolisis, Gly-8 a Gly-10, podemos escribir la reacción global de formación del piruvato:

$$\text{3-fosfoglicerato} + \text{ADP} \longrightarrow \text{piruvato} + \text{ATP} \qquad \mathbf{(9.15)}$$

Resumen de la glucolisis. Inicialmente se invierten dos moléculas de ATP en las reacciones Gly-1 y Gly-3, que son después devueltas en la primera fosforilación (Gly-7), de manera que las dos moléculas de ATP formadas por cada molécula de glucosa en la segunda fosforilación (Gly-10) representan el rendimiento neto de ATP de la ruta glucolítica. Se aprecia claramente cuando sumamos las tres reacciones que componen las tres fases de la ruta (Reacciones 9.13, 9.14 y 9.15). Las dos últimas reacciones se multiplican por dos contando con las dos triosas generadas en la Reacción 9.13. El resultado es una expresión global para la ruta de transformación de la glucosa a piruvato:

$$\text{Glucosa} + 2\text{NAD}^+ + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i \xrightarrow{\text{(reacciones Gly-1 a Gly-10)}} 2\ \text{piruvato} + 2\text{NADH}^+ + 2\text{H}^+ + 2\text{ATP} \qquad \mathbf{(9.16)}$$

La ruta es altamente exergónica en la dirección de la formación de piruvato. Bajo las condiciones intracelulares estádar del cuerpo, por ejemplo, la $\Delta G'$; para la ruta general de la glucosa a piruvato, con la formación de dos moléculas de ATP y un NADH, es de alrededor de -20 kcal/mol.

La ruta glucolítica es una de las rutas metabólicas más universales. Virtualmente, todas las células tienen la capacidad de extraer energía de la glucosa oxidándola a piruvato. Parte de esta energía se conserva en forma de dos moléculas de ATP por molécula de glucosa. Lo que sucede después, sin embargo, normalmente depende de la disponibilidad de oxígeno, porque el catabolismo más allá del piruvato es bastante diferente en condiciones aeróbicas o anaeróbicas.

El destino del piruvato depende de si el oxígeno se encuentra o no disponible

El piruvato ocupa una posición clave como punto de bifurcación en el metabolismo quimiótrofo de la energía (Figura 9.8). Su destino depende del tipo de organismo y de si hay oxígeno disponible. En presencia de oxígeno, el piruvato se oxida a otra molécula denominada acetil coenzima A (acetil CoA) que, sucesivamente, se puede oxidar completamente a CO_2, como describiremos en el Capítulo 10. Así, la ruta glucolítica se convierte en la primera de las componentes principales de la respiración aerobia (Figura 9.8a).

Una característica muy importante de la glucolisis, sin embargo, es que también puede tener lugar en ausencia de oxígeno. En condiciones anaerobias, no es posible la oxidación del piruvato, no se forma acetil coenzima A, y no se genera ATP adicional. En lugar de ello, las necesidades energéticas de la célula quedan satisfechas por el modesto rendimiento de ATP de la ruta glucolítica. En lugar de oxidarse, el piruvato se reduce aceptando los electrones (y protones) que se eliminan del NADH. Como ilustra la Figura 9.8, los productos más comunes de la reducción del piruvato son el lactato (parte b) o el etanol y el dióxido de carbono (parte c).

En ausencia de oxígeno, el piruvato entra en la ruta fermentativa y regenera NAD^+

Como se define generalmente, la ruta glucolítica acaba en la formación del piruvato. El proceso fermentativo, sin embargo, no puede acabar aquí, dada la necesidad de regenerar NAD^+, la forma oxidada de la coenzima A. Como indi-

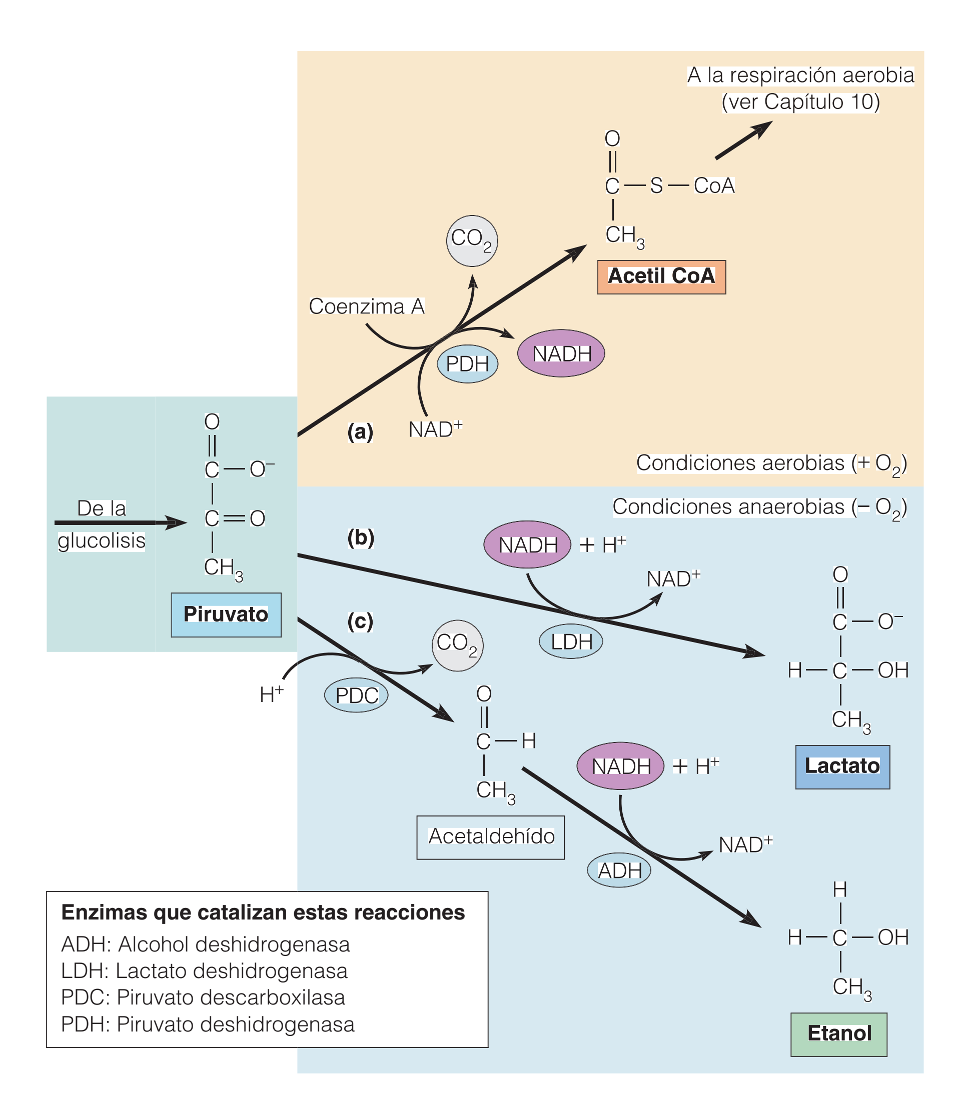


Figura 9.8 El destino del piruvato en condiciones aerobias y anaerobias. El destino del piruvato depende del organismo y de la disponibilidad de oxígeno. (**a**) En condiciones aerobias la mayoría de los organismos convierten el piruvato a una forma activa del acetato en una reacción que implica, tanto oxidación (con el NAD^+ como aceptor final de electrones), como descarboxilación (liberación de un átomo de carbono como CO_2). El acetato activado se une al transportador coenzima A como acetil coenzima A (acetilCoA). El acetilCoA entra después como sustrato en la respiración aerobia (*véase* el Capítulo 10). En condiciones anaerobias o de hipoxia el piruvato funciona como aceptor final de electrones para la oxidación del NADH a NAD^+, regenerando así la forma oxidada de la coenzima que se requiere en la reacción Gly-6 de la glucolisis. Los productos más comunes de la reducción del piruvato son (**b**) lactato (en la mayoría de las células animales y muchas bacterias) o (**c**) etanol y CO_2 (en muchas células vegetales y en levaduras y otros microorganismos). En el recuadro se enumeran las enzimas que catalizan estas reacciones.

ca la Reacción 9.16, la conversión de glucosa en piruvato requiere que una molécula de NAD^+ se reduzca a NADH por cada molécula de piruvato generada. Sin embargo, las coenzimas están presentes en las células en concentraciones muy pequeñas, de manera que la conversión de NAD^+ en NADH durante la glucolisis podría causar una pérdida muy rápida de NAD^+ si no existiera un mecanismo de regeneración de NAD^+.

En presencia de oxígeno, el NADH es reoxidado por la transferencia de sus electrones (y protones) al oxígeno, como veremos en el Capítulo 10. En condiciones anaerobias, sin embargo, los electrones se transfieren al piruvato, que tiene un grupo carbonilo que puede ser reducido a un grupo hidroxilo (*véase* Figura 9.8b y c). Las dos rutas de fermentación más comunes utilizan el piruvato como aceptor final de electrones, convirtiéndolo en lactato o en CO_2 y etanol. Veremos estas dos alternativas brevemente.

Fermentación del lactato. El proceso anaerobio que termina con la formación de lactato se denomina **fermentación láctica**. Como indica la Figura 9.8b, el lactato se genera por la transferencia directa de electrones del NADH al grupo carbonilo del piruvato, reduciéndolo al grupo hidroxilo del lactato. En base a una sola molécula de glucosa, esto se puede representar como:

$$2 \text{ piruvato} + 2\,\text{NADH} + 2\text{H}^+ \rightleftharpoons 2 \text{ lactato} + 2\text{NAD}^+ \quad \textbf{(9.17)}$$

Esta reacción es reversible; de hecho, la enzima que la cataliza se denomina lactato deshidrogenasa por su capacidad de catalizar la oxidación, o deshidrogenación, del lactato a piruvato.

Sumando las Reacciones 9.16 y 9.17 podemos escribir la ecuación global del metabolismo de la glucosa a lactato en condiciones anaerobias de la siguiente forma:

$$\text{Glucosa} + 2\text{ADP} + \text{P}_i \longrightarrow 2 \text{ lactato} + 2\text{ ATP} \quad \textbf{(9.18)}$$

La fermentación del lactato es la principal fuente energética para la mayoría de las bacterias anaerobias, así como para las células animales que se encuentran en condiciones anaeróbicas o de hipoxia (carencia de oxígeno). La fermentación del lactato es también muy importante para

nosotros a nivel comercial, ya que la producción del queso, yogurt y otros productos comunes dependen de la fermentación microbiana de la lactosa, el principal componente de la leche.

Un ejemplo de fermentación láctica lo representa el músculo durante los periodos de ejercicio muy intenso. Cuando las células utilizan oxígeno más deprisa del que éste puede ser proporcionado mediante el sistema circulatorio, se vuelven temporalmente hipóxicas. En este caso, el piruvato se reduce a lactato en lugar de seguir oxidándose como sucede en condiciones aeróbicas. (La acumulación de lactato resultante es lo que causa el dolor muscular que aparece tras el ejercicio intenso.) El lactato producido de esta forma se transporta por el sistema circulatorio desde el músculo al hígado. Allí se convierte de nuevo en glucosa por el proceso denominado *gluconeogénesis.* Como veremos más tarde en este capítulo, la gluconeogénesis es esencialmente la reacción opuesta a la fermentación láctica pero con varias diferencias fundamentales que permiten que sea exergónica en la dirección de la formación de glucosa.

Fermentación alcohólica. En condiciones anaerobias las células vegetales, así como las levaduras y otros microorganismos pueden llevar a cabo la **fermentación alcohólica** (por ejemplo, en raíces de troncos acuáticos). En este proceso, el piruvato pierde un átomo de carbono (como CO_2) para dar lugar al compuesto de dos carbonos acetaldehído. La reducción del acetaldehído por NADH da lugar al etanol, el alcohol que da nombre al proceso. Esta secuencia de reacciones de reducción está catalizada por dos enzimas, la *piruvato descarboxilasa* y la *alcohol deshidrogenasa* respectivamente (Figura 9.8c). La reacción global se puede resumir de la siguiente forma:

$$\text{2 piruvato} + \text{2NADH} + 4\,\text{H}^+ \longrightarrow \text{2 etanol} + 2\text{CO}_2 + 2\text{NAD}^+ \qquad \textbf{(9.19)}$$

Sumando este paso de reducción a la ecuación global de la glucolisis (Reacción 9.16) llegamos a la siguiente ecuación para la fermentación alcohólica:

$$\text{Glucosa} + \text{2ADP} + 2\text{P}_i + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{2 etanol} + 2\text{CO}_2 + \text{2ATP} \qquad \textbf{(9.20)}$$

La fermentación alcohólica tiene un significado económico considerable ya que este proceso, llevado a cabo por levaduras, es la clave de las industrias panadera, cervecera y vinícola. En la panadería, el dióxido de carbono es un producto final importante. Se añade levadura a la masa del pan para romper la glucosa anaeróbicamente, generando CO_2 y etanol. El dióxido de carbono queda atrapado en la masa haciendo que suba y el alcohol se elimina cuando se cuece el pan y es responsable del agradable aroma del pan recién cocido. Para la cerveza, tanto el CO_2 como el etanol son esenciales; el etanol hace del producto una bebida alcohólica y el CO_2 influye en la carbonatación.

Otras rutas fermentativas. Aunque el lactato y el etanol son los productos de fermentación de mayor importancia económica y fisiológica, no son los únicos productos de la fermentación microbiana. En la *fermentación del propionato*, por ejemplo, las bacterias reducen el piruvato a propionato ($CH_3{-}CH_2{-}COO^-$), una reacción importante para la elaboración del queso suizo. Muchas bacterias pueden deteriorar alimentos por medio de la fermentación butiléngl icólica. Otros procesos fermentativos producen acetona, alcohol isopropílico o butirato, responsable del desagradable olor de la comida rancia. Sin embargo, todas estas reacciones son sólo variaciones metabólicas del proceso común de reoxidación del NADH por transferencia de electrones de algún aceptor orgánico.

La fermentación libera sólo una pequeña fracción de la energía libre del sustrato pero conserva esa energía eficientemente como ATP

Una característica fundamental de todos los procesos fermentativos es que *no hay un aceptor de electrones externo y no se da una oxidación total.* Tanto en la fermentación alcohólica como en la láctica, por ejemplo, el NADH generado por el paso de oxidación de la glucolisis (reacción Gly-6) se reoxida en la última reacción de la secuencia (Reacciones 9.17 y 9.19, respectivamente). Dado que no hay una oxidación neta, la fermentación tiene un rendimiento de ATP muy modesto, dos moléculas de ATP por molécula de glucosa en el caso de la fermentación alcohólica o láctica.

La mayor parte de la energía libre de la molécula de glucosa se encuentra todavía presente en las moléculas de etanol y lactato. En el caso de la fermentación láctica, por ejemplo, las dos moléculas de lactato que se producen por cada molécula de glucosa, contienen la mayor parte de las 686 kcal de energía libre presentes en cada molécula de glucosa, ya que la oxidación aeróbica completa del lactato tiene una $\Delta G°'$ de -319.5 kcal/mol. En otras palabras, alrededor del 93% ($2 \times 319.5/686 \times 100\%$) de la energía libre original de la glucosa se encuentra todavía presente en las dos moléculas de lactato y sólo se obtiene alrededor del 7% (47 kcal/mol) de esta energía libre potencialmente disponible.

Aunque el rendimiento de energía libre de la fermentación del lactato es bajo, la energía libre disponible se conserva eficientemente como ATP. Usando los cambios de energía libre estándar, estas dos moléculas de ATP representan $2 \times 7{,}3 = 14{,}6$ kcal/mol. Esto corresponde a un eficiencia de conservación energética de alrededor del 30% ($14{,}6/47 \times 100\%$). Basándonos en los valores reales de $\Delta G'$ de la hidrólisis del ATP en las condiciones celulares (en un rango de entre -10 y -14 kcal/mol), dos moléculas de ATP representan al menos 20 kcal/mol, lo que significa que la eficiencia de conservación de energía probablemente es superior al 40%.

Sustratos alternativos para la glucolisis

Hasta ahora hemos asumido que la glucosa es el punto inicial de la glucolisis, y por tanto, por su importancia, para todo el metabolismo energético celular. La glucosa es ciertamente un sustrato fundamental tanto para la fermentación, como para la respiración en muchos organismos y tejidos. Sin embargo, no es el único sustrato. De hecho, hay muchos organismos y tejidos de organismos para los que la glucosa no es tan importante. Así, es importante preguntarse cuáles son las principales alternativas a la glucosa y cómo son utilizadas por la célula.

Y así surge un principio general: *Cualquiera que sea la naturaleza química del sustrato alternativo, éste se convierte en un intermediario de la principal ruta catabólica de la glucosa, en el menor número de pasos posible.* Por ejemplo, la mayoría de los carbohidratos se convierten en intermediarios de la ruta glucolítica. Para hacer hincapié en este punto, consideraremos brevemente dos tipos de sustratos alternativos distintos de los azúcares y carbohidratos.

El glicerol y otros azúcares se catabolizan también por la ruta glucolítica

Existen otros muchos azúcares distintos de la glucosa disponibles en la célula, dependiendo de las fuentes de alimento de los organismos en cuestión. La mayoría de ellos son monosacáridos (normalmente hexosas o pentosas) o disacáridos que pueden ser hidrolizados en los monosacáridos que los componen. Una tableta de azúcar (sacarosa), por ejemplo, es un disacárido que consta de dos hexosas, glucosa y fructosa, y el azúcar de la leche (lactosa) contiene glucosa y galactosa (*véase* Figura 3.23). Además de la glucosa, la fructosa y la galactosa, la manosa es otra hexosa relativamente común en la dieta.

La Figura 9.9 ilustra las reacciones que introducen varios carbohidratos en la ruta glucolítica. En general, los disacáridos se hidrolizan en los monosacáridos que los componen, y cada monosacárido se convierte en un intermediario glucolítico, en uno o más pasos. La glucosa y la fructosa entran más directamente, tras la fosforilación del carbono 6. La manosa se convierte en manosa-6-fosfato y luego en fructosa-6-fosfato, un intermediario glucolítico. La entrada de la galactosa requiere una secuencia de reacciones algo más compleja (*véanse* Figura 9.9 y el Problema 9.8, al final de este capítulo).

Las pentosas fosforiladas también pueden dirigirse a la ruta glucolítica, pero sólo tras haber sido convertidas a hexosas fosfato. Esta conversión se lleva a cabo en una secuencia metabólica denominada *ruta del fosfogluconato.* El glicerol, un compuesto de tres carbonos que se forma por degradación de los lípidos, entra en la glucolisis después de su conversión en dihidroxiacetona fosfato (Figura 9.9). Así, la célula normal tiene capacidades metabólicas para convertir la mayoría de los azúcares (así como otros compuestos) en alguno de los intermediarios glucolíticos, para seguir siendo metabolizados en condiciones aeróbicas o anaeróbicas.

Los polisacáridos se degradan para dar lugar a azúcares fosfato que entran en la ruta glucolítica

Aunque la glucosa es el sustrato inmediato, tanto de la fermentación, como de la respiración en muchas células y tejidos, no se encuentra presente como monosacárido libre durante mucho tiempo. Por el contrario, suele encontrarse en forma de polisacáridos de reserva, principalmente en forma de almidón en las plantas y glucógeno en los animales. Una de las ventajas del almacenamiento de glucosa como almidón y glucógeno es que estos polímeros de la glucosa son insolubles en agua de manera que no se supera el límite de solubilidad de la célula. Como se indica en la Figura 9.10, estos polisacáridos almacenados pueden movilizarse por un proceso denominado *ruptura fosforolítica.* La fosforolisis recuerda a la hidrólisis pero utiliza fosfato inorgánico en lugar de agua para romper el enlace químico. El fosfato inorgánico se usa para romper el enlace $\alpha(1\rightarrow4)$ entre unidades contiguas de glucosa, liberando monómeros de glucosa como la glucosa-1-fosfato. La glucosa-1-fosfato así formada puede ser convertida en glucosa-6-fosfato, que es posteriormente catabolizada en la ruta glucolítica.

Así, vemos que la glucosa almacenada en forma de polímero entra en la ruta glucolítica en forma de glucosa-6-fosfato, sin la necesidad del ATP requerido para la fosforilación inicial de los azúcares libres. En consecuencia, el rendimiento energético total es mayor por molécula de ATP cuando se cataboliza desde el nivel de polisacárido que cuando se cataboliza con el azúcar libre como sustrato inicial. Sin embargo, éste no es un caso de cesión de algo a cambio de nada ya que se requiere energía en el proceso de polimerización, para la adición de unidades de glucosa a la cadena de glucógeno o almidón durante la síntesis de polisacáridos.

Gluconeogénesis

Las células no sólo son capaces de catabolizar glucosa y otros carbohidratos para conseguir energía sino que pueden sintetizar azúcares y polisacáridos para otros propósitos. El proceso de síntesis de glucosa se denomina **gluconeogénesis** que literalmente significa génesis o formación de glucosa. Más específicamente, la gluconeogénesis se define como el proceso por el que las células animales (y otras) sintetizan glucosa (y otros carbohidratos) a partir de precusores tri y tetracarbonados que no se suelen encontrar como carbohidratos en la naturaleza. El material ini-

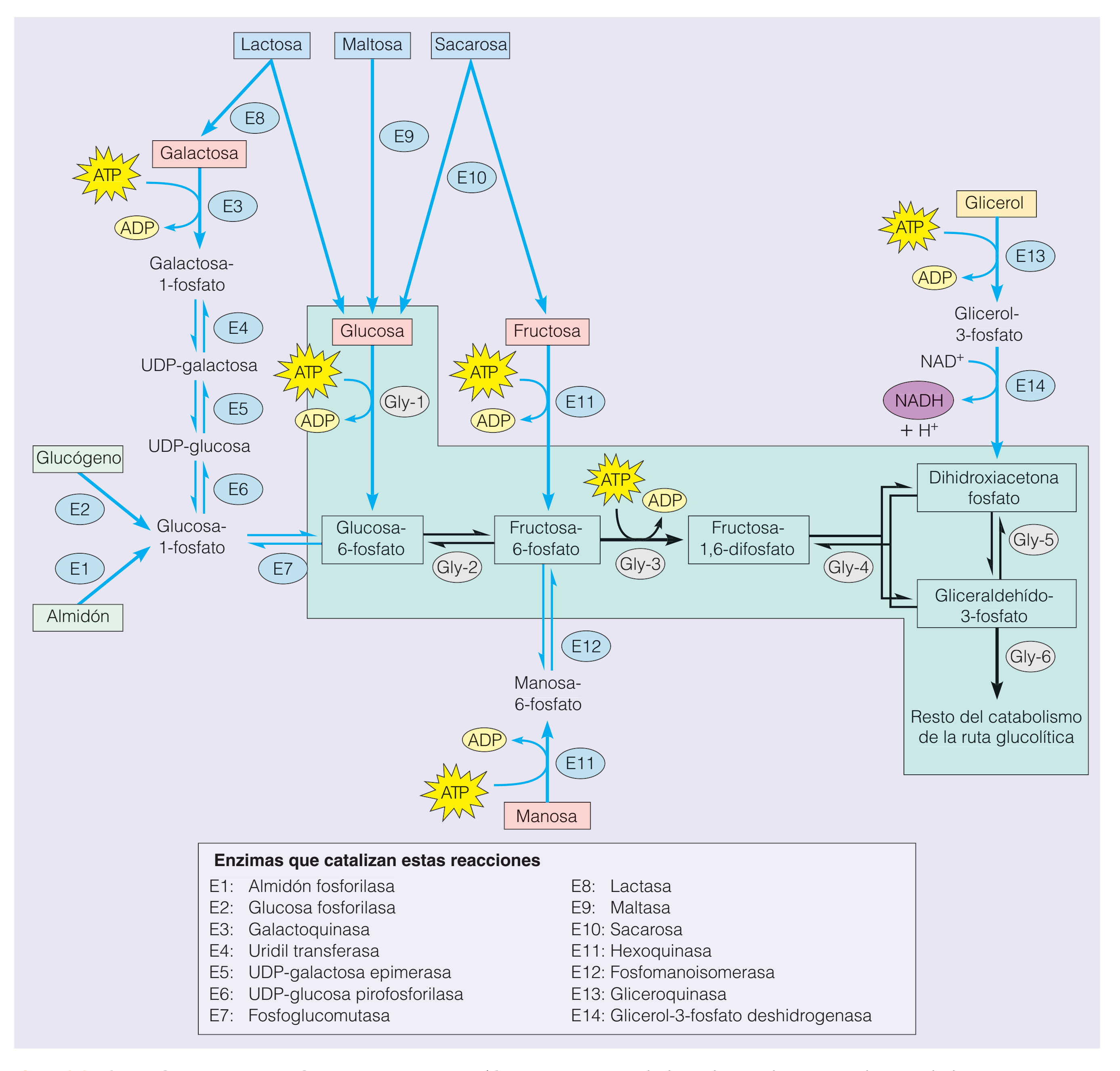


Figura 9.9 **Catabolismo de los carbohidratos por la ruta glucolítica.** Los sustratos hidrocarbonatados que pueden metabolizarse por conversión a un intermediario de la ruta glucolítica, se indican en los recuadros coloreados. Entre ellos se encuentran las hexosas galactosa, glucosa, fructosa y manosa; los disacáridos lactosa, maltosa y sacarosa; los polisacáridos glucógeno y almidón y el compuesto de tres carbonos, glicerol. Las reacciones reversibles se representan en flechas azules. Las enzimas que catalizan estas reacciones se enumeran en el recuadro. En verde se representan las seis primeras reacciones de la ruta glucolítica; *véase* la Figura 9.6 para encontrar los nombres de las enzimas que catalizan estas reacciones. En algunos casos, puede haber otras enzimas o reacciones implicadas, dependiendo del organismo o del tejido.

cial más común es el piruvato, o el lactato, en el que se convierte el piruvato en condiciones anaeróbicas.

La Figura 9.11 compara la gluconeogénesis y la glucolisis. Las dos rutas tienen mucho en común; de hecho, siete de las reacciones de la ruta gluconeogénica se dan por simple reversión de las reacciones correspondientes de la glucolisis (reacciones Gly-2 y Gly-4 a Gly-9). En cada caso, las mismas enzimas catalizan las dos reacciones. Sin embargo, no todos los pasos de la ruta gluconeogénica son simplemente los reversos de las reacciones glucolíticas. Como se ilustra en la Figura 9.11, tres de las reacciones de la ruta glucolítica —la primera, la tercera y la décima— se llevan a

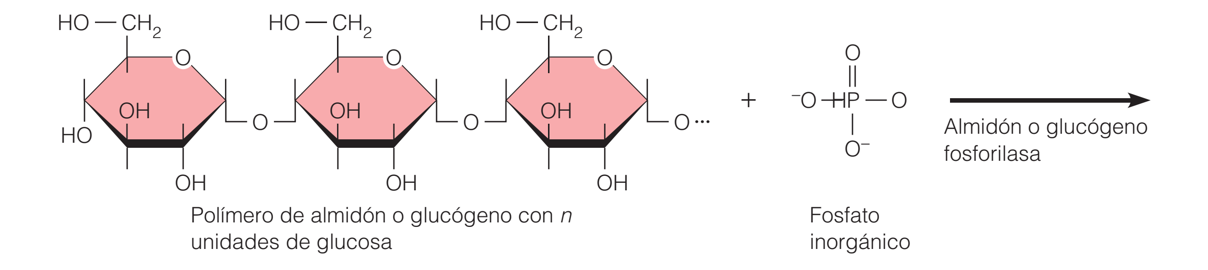


Figura 9.10 Ruptura fosforolítica de polisacáridos de reserva. Las unidades de glucosa terminales de los polisacáridos de reserva, como el almidón o el glucógeno, se liberan como glucosa-1-fosfato por ruptura fosforolítica. La glucosa-1-fosfato se convierte luego en glucosa-6-fosfato y es catabolizada en la ruta glucolítica, como se muestra en la Figura 9.6.

Glucosa-1-fosfato

Polímero de almidón o glucógeno con $n - 1$ unidades de glucosa

cabo de forma distinta en la dirección de la gluconeogénesis. De hecho, estas diferencias ilustran bien un principio importante del metabolismo celular: *las rutas biosintéticas son, rara vez, el reverso de las correspondientes rutas catabólicas.* Este principio está basado en los requerimientos energéticos en cada sentido.

Para que una ruta metabólica sea termodinámicamente favorable en una dirección específica, debe ser suficientemente exergónica en esa dirección. Esto es especialmente cierto en el caso de la glucolisis; recordemos que la secuencia general del paso de glucosa a piruvato, como se resume en la Reacción 9.16, tiene una $\Delta G'$ de alrededor de -20 kcal/mol en las condiciones intracelulares estándar del cuerpo humano. Por tanto, la $\Delta G'$ del proceso reverso será de alrededor de $+20$ kcal/mol, haciendo que la síntesis de glucosa por reversión directa de la glucolisis sea un proceso altamente endergónico y por lo tanto termodinámicamente imposible.

La gluconeogénesis puede darse porque las tres reacciones más exergónicas de la ruta glucolítica (Gly-1, Gly-3 y Gly-10) no son simplemente pasos inversos de la ruta gluconeogénica. Así, la ruta gluconeogénica tiene *reacciones «bypass»* en cada uno de estos pasos —reacciones alternativas que evitan las tres reacciones glucolíticas cuya reversibilidad es más difícil—. De hecho, estas tres reacciones de la ruta glucolítica que se evitan en la gluconeogénesis de la Figura 9.11, se muestran como unidireccionales en la Figura 9.6. En cada uno de estos tres ejemplos, las reacciones alternativas de la gluconeogénesis evitan la irreversibilidad del paso glucolítico.

Tanto en Gly-1 como en la reacción Gly-3, la alternativa a los requerimientos de síntesis de ATP en la reacción reversa es una reacción de hidrólisis (*véase* Figura 9.11). Vemos cómo, efectivamente, esta táctica supera el obstáculo metabólico. En el caso de la interconversión de la glucosa en glucosa-6-fosfato, por ejemplo, la reacción es exergónica en la dirección glucolítica gracias a la entrada de una molécula de ATP. En la dirección gluconeogénica, se asegura que la reacción es exergónica por la hidrólisis del enlace fosfoester, que tiene una $\Delta G^{o\prime}$ de $-3{,}3$ kcal/mol.

El tercer paso en el que la ruta glucolítica es irreversible, la reacción Gly-10, se evita en la gluconeogénesis por una secuencia de dos reacciones (Figura 9.11). Estas dos reacciones se dan por hidrólisis de un enlace fosfoanhídrido, del ATP en un caso y del GTP (un compuesto relacionado) en el otro. (GTP es la abreviatura de guanosina trifosfato; veáse la estructura de la guanina en la Figura 3-15). La primera de estas reacciones es la adición de CO_2 al piruvato —reacción de *carboxilación.* Así se forma un compuesto de cuatro átomos de carbono denominado oxalacetato, que volveremos a encontrar en el capítulo siguiente . En la segunda reacción se elimina el grupo carboxilo —reacción de *descarboxilación*— para dar lugar a fosfoenolpiruvato (PEP). En este caso, el GTP, que es energéticamente equivalente al ATP, aporta tanto el grupo fosfato como la energía necesaria.

El papel de estas reacciones queda claro cuando se comparan directamente las rutas gluconeogénica y glucolítica (*véase* Figura 9.11). La glucolisis requiere dos moléculas de ATP pero genera 4 ATPs, con un rendimiento neto de dos moléculas de ATP por molécula de glucosa catabolizada. Por otro lado, la gluconeogénesis requiere cuatro ATPs y dos GTPs por glucosa, o lo que es lo mismo, se consumen el equivalente a seis moléculas de ATP por cada molécula de glucosa sintetizada. La diferencia de cuatro moléculas de ATP por cada glucosa supone la suficiente energía para asegurar que la gluconeogénesis se llevará a cabo al menos tan endergónicamente en el sentido de síntesis de la glucosa, como exergónicamente en el sentido de la catálisis de la glucosa.

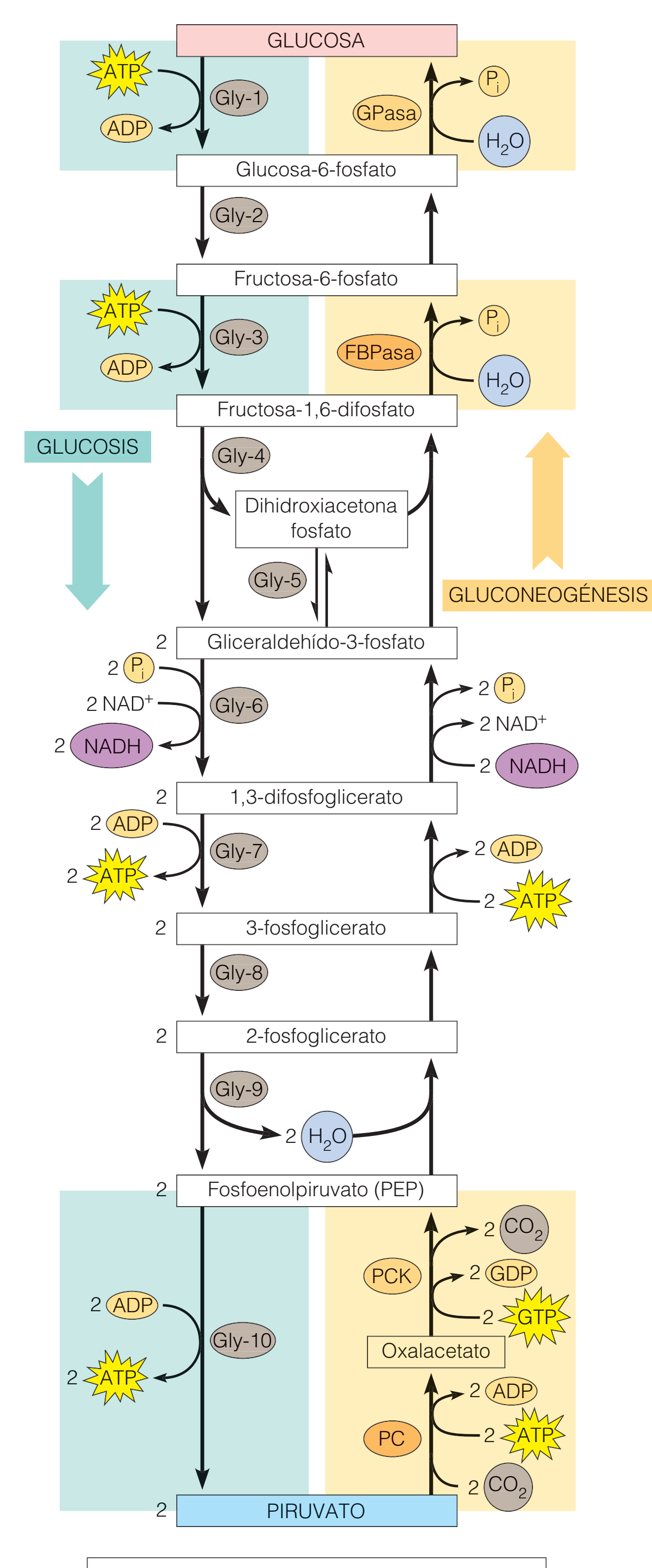


Figura 9.11 Rutas comparadas de la gluoconeogénesis y la glucolisis. Las rutas de la glucolisis (izquierda) y gluconeogénesis (derecha) tienen nueve intermediarios y siete reacciones en común. Las tres reacciones esencialmente irreversibles de la ruta glucolítica (sombreadas en verde) se evitan en la gluconeogénesis con cuatro reacciones alternativas (sombreadas en amarillo). Como ruta catabólica, la glucolisis es inherentemente exergónica, capaz de producir dos moléculas de ATP por glucosa. La gluconeogénesis, por otra parte, es una ruta anabólica que requiere la hidrólisis acoplada de seis enlaces fosfoanhídrido (cuatro del ATP y dos del GTP) para darse en el sentido de formación de glucosa. En el recuadro, representadas en dorado, se muestran las enzimas que catalizan las reacciones de la gluconeogénesis, que evitan a las irreversibles de la glucolisis (los nombres de las enzimas que catalizan estas últimas se encuentran en la Figura 9.6). La glucolisis se da en el músculo y otros tejidos, mientras que la gluconeogénesis ocurre fundamentalmente en el hígado.

Regulación de la glucolisis y gluconeogénesis

Dado que las células tienen enzimas que catalizan tanto las reacciones de glucolisis como la de gluconeogénesis, es crucial evitar que las dos rutas se den simultáneamente en la misma célula, pues sería un ciclo inútil. Podríamos preguntarnos, ¿cómo se puede controlar la síntesis y la degradación de la glucosa? Una posible solución es que estas rutas tuviesen lugar en células separadas, como se observa en las células musculares y hepáticas de la Figura 9A-2. Veremos otra solución, y cómo la glucolisis y gluconeogénesis se pueden regular en una misma célula.

Como todas las rutas metabólicas, la glucolisis y la gluconeogénesis presentan tasas de regulación que se ajustan a las necesidades de las células y de los organismos, en base a la concentración de sus productos, el ATP y la glucosa respectivamente. No es sorprendente, por tanto, que la glucolisis y la gluconeogénesis estén reguladas de forma excluyente: se sabe que las condiciones intracelulares que estimulan una ruta, tienen un efecto inhibitorio en la otra. Además, la glucolisis está estrechamente coordinada con otras rutas importantes de generación y utilización de energía en la célula, especialmente las rutas implicadas en la respiración aerobia que consideraremos en el Capítulo 10.

La regulación de la glucolisis y de la gluconeogénesis en las células animales implica a uno o dos de los dos principales mecanismos de control —la *regulación alostérica* y la *regulación hormonal*—. La regulación alostérica afecta a la actividad enzimática y es un mecanismo típicamente intracelular. La regulación hormonal, por otra parte, suele ser una reacción intercelular porque la señal iniciadora es una hormona producida en otra parte del cuerpo, a menudo distante. Aquí consideraremos la regulación alostérica, centrándonos especialmente en los hepatocitos, que tienen las enzimas de la glucolisis y gluconeogénesis. Más adelante, en el Capítulo 14, estudiaremos la regulación hormonal en el contexto de la transducción de señales.

Las enzimas clave en las rutas glucolítica y gluconeogenética están sujetas a regulación alostérica

Recordemos del Capítulo 6 que la **regulación alostérica** de la actividad enzimática implica la alternancia entre dos formas de una enzima, una de las cuales es catalíticamente activa (o más activa), mientras la otra es inactiva (o menos activa). El que una enzima se encuentre en su forma activa o inactiva depende de si el efector alostérico específico se une al sitio alostérico y de si tal efector es un activador o un inhibidor alostérico (*véase* Figura 6.16).

La Figura 9.12 muestra las enzimas reguladoras clave de las rutas glucolítica y gluconeogenética y los efectores alostéricos que regulan cada enzima. Para la glucolisis, las enzimas clave son la hexoquinasa, la fosfofructoquinasa-1 (PFK-1) y la piruvato quinasa. Para la gluconeogénesis, la fructosa-1,6-difosfato y la piruvato carboxilasa. Los efectores alostéricos mostrados en la Figura 9.12, identificados primero en estudios con células hepáticas, se definen como activadores (+) o inhibidores (−) de las enzimas a las que se unen. En esta figura destacan varios puntos. Por ejemplo, que *cada una de las enzimas reguladoras es única en su ruta*, haciendo por lo tanto posible que cada ruta sea regulada independientemente del resto. Observe también *la naturaleza recíproca de la regulación de las dos rutas*: el AMP y la acetilCoA, los dos efectores a los que son sensibles ambas rutas, tienen efectos opuestos en los dos sentidos. El AMP, por ejemplo, activa la glucolisis pero inhibe la gluconeogénesis, mientras que la acetilCoA activa la gluconeogénesis pero inhibe la glucolisis.

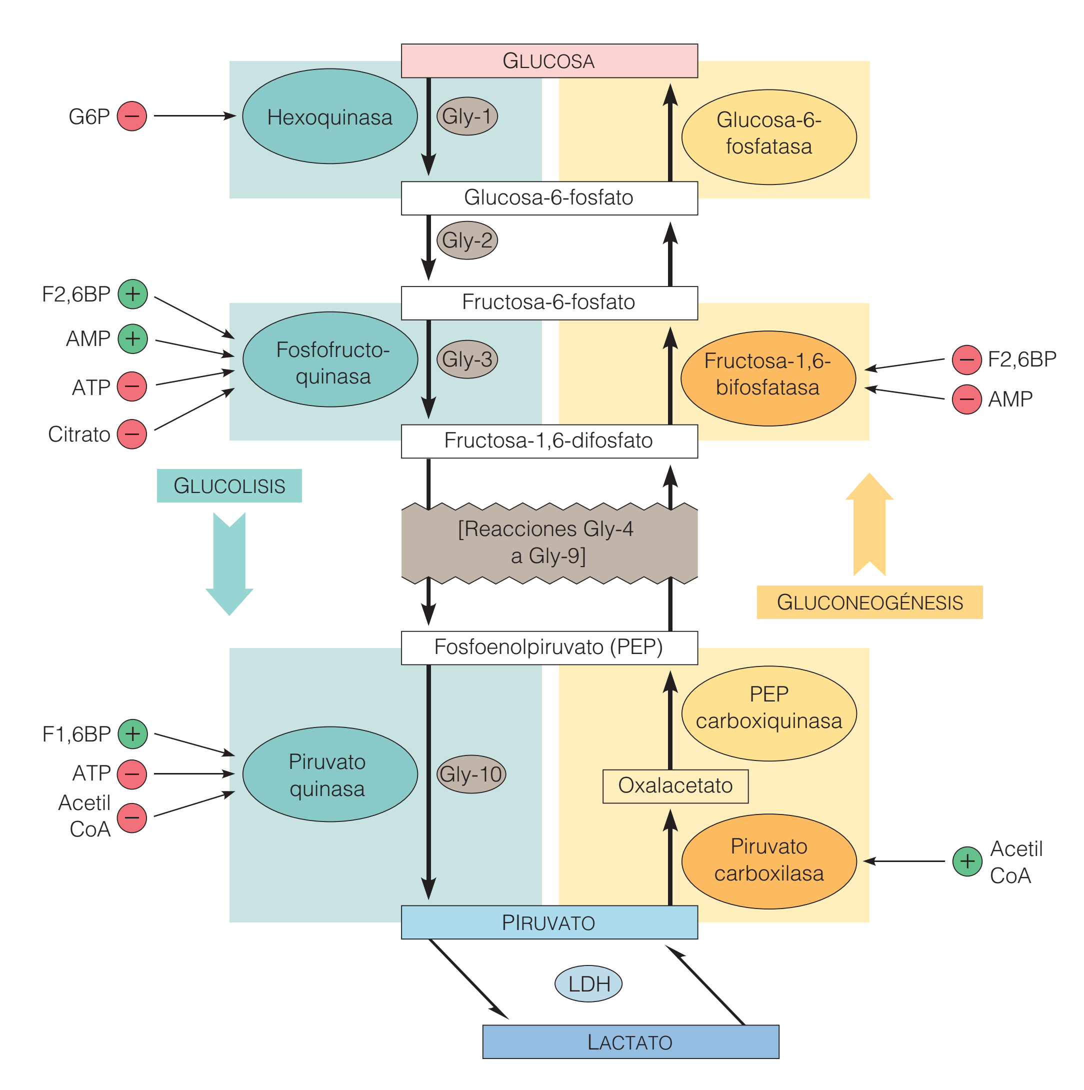


Figura 9.12 Regulación de la glucolisis y de la gluconeogénesis. La glucolisis y la gluconeogénesis se regulan de manera recíproca. En ambos casos, la regulación implica activación alostérica (+) o la inhibición (−) de las enzimas que catalizan reacciones únicas de la ruta. Para la glucolisis, las enzimas reguladoras clave son aquellas que catalizan las tres reacciones irreversibles (verde). Para la gluconeogénesis, los sitios principales de regulación son dos de las cuatro enzimas que evitan las reacciones irreversibles equivalentes de la glucolisis (dorado). La regulación alostérica incluye a las sustancias acetilCoA, AMP, ATP, citrato, fructosa-1,6-difosfato (F1, 6BP) y glucosa-6-fosfato (G6P). La acetilCoA y el citrato son intermediarios de la respiración aerobia. La fosfofructoquinasa-2 (PFK-2) sintetiza F2,6BP, como se muestra en la Figura 9.13a.

Es más, los efectos de los agentes reguladores se verifican en la forma esperada; es decir, se encuentran invariablemente en el sentido que podríamos predecir, basándonos el conocimiento del papel que desempeña cada ruta en la célula. Consideremos, por ejemplo, los efectos del ATP y del AMP. Cuando la concentración de ATP es baja y la concentración de AMP es alta, la célula tiene claramente poca energía, de manera que es razonable que el AMP active la glucolisis. Por otro lado, si la concentración de ATP aumenta y la de AMP disminuye, los efectos estimulatorios del AMP en la glucolisis caen y entran en juego los efectos inhibitorios del ATP y de la PFK-1 y del piruvato, reduciendose, en consonancia, la tasa de glucolisis.

Puede que le sorprenda saber que el ATP es un inhibidor alostérico de la PFK-1, porque esta enzima tiene como sustrato al propio ATP. Esto parece contradictorio porque un incremento en la concentración de sustrato debería *incrementar* la tasa de catálisis enzimática de esta reacción. Esta aparente contradicción, sin embargo, es fácil de explicar. Como enzima alostérica, la PFK-1 tiene un sitio activo y un sitio alostérico. El sitio activo de PFK-1 tiene alta afinidad por el ATP, mientras que el sitio alostérico tiene poca afinidad por esta molécula. Así, a baja concentración de ATP, se da la unión al sitio activo pero no al sitio alostérico de manera que las moléculas de PFK-1 permanecen en su forma activa y puede darse la glucolisis. A medida que se incrementa la concentración de ATP, aumenta la unión al sitio alostérico, convirtiendo cada vez más moléculas de PFK-1 a la forma inactiva y, por tanto, ralentizando la secuencia glucolítica global.

Tanto la ruta glucolítica como la gluconeogénica (Figura 9.12) están sujetas a regulación alostérica por componentes implicados en la respiración. Como veremos en el próximo capítulo, la acetilCoA y el citrato son compuestos clave en una ruta aerobia denominada *ciclo de los ácidos tricarboxilícos*. Los niveles altos de acetilCoA y de citrato indican que la célula está bien provista de sustrato para la siguiente fase del metabolismo, posterior al piruvato. Así, no es sorprendente encontrar que la acetilCoA y el citrato tengan efectos inhibitorios en la glucolisis, reduciendo la tasa de formación del piruvato. De la misma forma, el efecto estimulatorio de la acetilCoA sobre la gluconeogénesis es consecuente con la disponibilidad de piruvato para la formación de glucosa.

La fructosa-2,6-bifosfato es un importante regulador de la glucolisis y de la gluconeogénesis

Aunque todos los mecanismos anteriores tienen un importante papel en la regulación de la glucolisis y gluconeogénesis, el regulador más importante en ambas rutas es la **fructosa-2,6-bifosfato (F2,6BP)**. La F2,6BP se sintetiza por fosforilación dependiente de ATP de la fructosa-6-fosfato (Figura 9.13a), la misma reacción que da lugar a la fructosa-1,6-bifosfato en la reacción Gly-3 de la glucolisis (Figura 9.13b). Sin embargo, la síntesis de F2,6BP está catalizada por otra forma de la fosfofructoquinasa, llamada **fosfofructoquinasa-2 (PFK-2)** para distinguirla de la PFK-1, la enzima glucolítica. Como se indica en la Figura 9.12, la F2,6BP activa a la enzima glucolítica (PFK-1) que fosforila la glucosa-6-fosfato e inhibe la enzima gluconeogenética (FBPasa), que cataliza la reacción inversa.

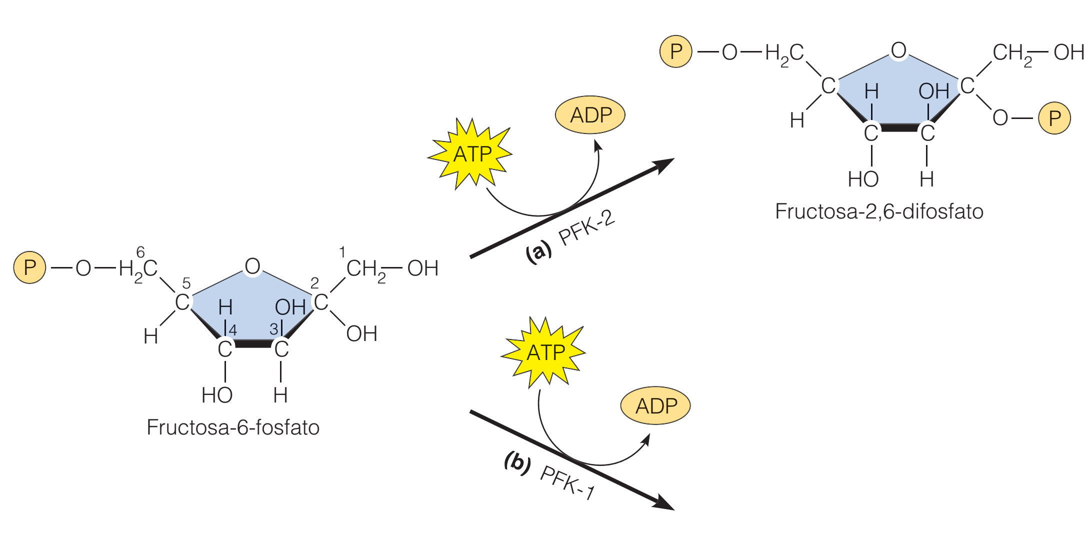


Figura 9.13 Síntesis de la fructosa-2,6-difosfato. La fructosa-6-difosfato puede ser fosforilada (**a**) en el carbono 2, por la fosfofructoquinasa-2 (PFK-2) para dar lugar a fructosa-2,6-difosfato, o en el carbono 1, por la enzima fosfofructoquinasa-1 (PFK-1) para formar fructosa-1,6-difosfato (como en la reacción Gly-4 de la glucolisis). En la Figura 9.14 se describen las funciones reguladoras de PFK-2 y F2,6BP.

¿Qué pasa con el azúcar?

Igual de importante que adquirir el conocimiento académico de procesos como la glucolisis y la gluconeogénesis, es saber lo que esto significa para usted mismo. ¿Podrá usar la información de este capítulo y del próximo, para comprender de qué manera encuentra su organismo la energía que necesita? ¿Cómo utiliza los nutrientes que usted consume?

Para ser más explícitos, ¿puede relacionar lo que está aprendiendo en estos capítulos con lo que las células de su cuerpo están haciendo con la comida que tomó en el desayuno esta mañana? Cuando le echa azúcar al café o a los cereales, puede contestar a la pregunta: ¿qué pasa con este azúcar? Las siguientes líneas se centrarán en estas cuestiones y le ayudarán a apreciar la relevancia de estos capítulos haciéndole ver cómo puede aplicar a la vida diaria, la información académica que recibe.

Para seguir con el ejemplo, vamos a centrarnos en el tazón de cereales (Figura 9A-1), considerando el disacárido sacarosa (del tarro de azúcar), el disacárido lactosa (de la leche) y el polisacárido almidón (de los cereales). Vamos a seguir primero a los azúcares y el almidón a lo largo del tubo digestivo; después seguiremos a la glucosa por la sangre y por último nos ocuparemos de las formas en que la utilizan las células de las distintas partes del cuerpo.

Vamos a empezar por la cucharada de cereales que se acaba de comer. La sacarosa y la lactosa permanecen intactas hasta que llegan al intestino, pero la digestión del almidón empieza en la boca porque la saliva contiene amilasa, una enzima que rompe el almidón en pequeños polisacáridos. La digestión continua en el intestino, donde la amilasa pancreática completa la degradación del almidón hasta el disacárido maltosa.

La maltosa producida a partir del almidón se hidroliza a glucosa en el intestino por actividad de la enzima maltasa. La maltasa es una de las disacaridasas intestinales, específicas de los distintos tipos de disacáridos. La lactosa de la leche y el azúcar que le añade a sus cereales son hidrolizados por otros miembros de esta familia —la lactasa y sacarasa respectivamente—. La lactosa genera una molécula de glucosa y otra de galactosa, mientras que la sacarosa se hidroliza a glucosa y fructosa (*véase* Figura 9.9). En algunas personas, la lactosa intestinal desaparece gradualmente después de los 4 años, cuando desciende el consumo de leche. Si estas personas ingieren leche u otros productos derivados, pueden sufrir calambres o diarrea, una condición conocida como *intolerancia a la lactosa*.



Figura 9A.1 ¿Qué pasa con el azúcar? ¿Se pregunta esto cuando añade azúcar a los cereales de su desayuno?

La glucosa, galactosa y fructosa se absorben en las células epiteliales. Estas células tienen numerosas microvellosidades que se proyectan hacia la luz intestinal, incrementando así la superficie de absorción de la célula (*véase* la Figura 4.2). Es más, las dos capas de células epiteliales separan los nutrientes de la luz intestinal, de la sangre de los capilares. Algunos azúcares, como la fructosa, se mueven a través de la membrana plasmática de una célula epitelial por difusión facilitada ya que las concentraciones de estos azúcares son menores en la sangre que en la luz intestinal. Sin embargo, la glucosa se mueve por transporte activo, dado que se encuentra muy concentrada en la sangre.

La fructosa y la galactosa se transportan a través del torrente sanguíneo a distintos tejidos del cuerpo. En un determinado momento las células absorben estos azúcares y los convierten en intermediarios de la ruta glucolítica, como se muestra en las Figuras 9.9 y 9.11. La ruta para la utilización de la galactosa es más compleja que la de otros azúcares sencillos, ya que se necesitan cinco reacciones para convertir la galactosa en glucosa-6-fosfato. Un defecto genético en esta ruta puede derivar en una incapacidad para metabolizar la galactosa, lo que supone un incremento de los niveles de galactosa en sangre y de glucosa-6-fosfato en los tejidos. Esta alteración, denominada *galactosemia*, tiene graves consecuencias, que incluyen el retraso mental. Se presenta durante la lactancia, ya que la principal fuente de galactosa es la leche. Si se detecta pronto, pueden prevenirse los síntomas mediante eliminación o reducción de la cantidad de leche y sus derivados en la dieta.

El azúcar mayoritario en la sangre es, por supuesto, la glucosa. Su concentración en sangre a las pocas horas de haber comido es, probablemente, de alrededor de 80 mg% (80 mg por cada 100 ml de sangre, o alrededor de 4,4 mM). El nivel puede subir hasta 120 mg% (6,6 mM) poco después de haber comido. Sin embargo, en general el nivel de glucosa en sangre se mantiene dentro de unos límites estrechos. El mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre es una de las funciones reguladoras más importantes de su cuerpo, especialmente para el correcto funcionamiento de su cerebro y sistema nervioso. El nivel de glucosa en sangre de está regulado por varias hormonas, como la insulina, el glucagón, la adrenalina y la noradrenalina (*véase* el Capítulo 14).

Una vez que ha llegado a la sangre, la glucosa se transporta a las células de todas las partes de su cuerpo donde tiene cuatro destinos principales: puede ser oxidada completamente hasta CO_2 por la respiración aerobia, puede ser fermentada anaeróbicamente a lactato, puede usarse para la síntesis del polisacárido glucógeno, o puede convertirse en grasa corporal.

La respiración aerobia es el destino más común de la glucosa porque la mayoría de los tejidos funcionan aeróbicamente la mayor parte del tiempo. Su cerebro es un ejemplo particularmente destacable de órgano aeróbico. El cerebro necesita grandes cantidades de energía para mantener los potenciales de membrana necesarios para la transmisión del

impulso nervioso y esto depende sólo de que consiga los niveles de glucosa que necesita. De hecho, el cerebro necesita alrededor de 120 mg de glucosa al día, que supone alrededor del 15% de la energía total que usted consume. Cuando descansa, la actividad de su cerebro supone cerca del 60% del consumo de glucosa y alrededor del 20% del consumo total de oxígeno. Como el cerebro no almacena glucógeno, el aporte de glucosa y oxígeno deben ser continuos. Incluso una corta interrupción en el suministro de ambos puede ser fatal. El corazón tiene requerimientos similares porque es también un órgano aeróbico con pocas o ninguna capacidad de reserva. Por tanto, el suministro de moléculas de oxígeno y combustible debe ser constante, aunque el corazón, a diferencia del cerebro, puede usar distintas moléculas de combustible, como la glucosa, el lactato y los ácidos grasos.

La glucosa puede ser catabolizada, además de por respiración aerobia, de forma anaeróbica (fermentada a lactato), especialmente en células sanguíneas de la serie roja y en células del músculo esquelético. Las células de la serie roja no tienen mitocondrias y dependen exclusivamente de la glucolisis para conseguir la energía que necesitan. El músculo esquelético puede funcionar tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Cuando realizamos un ejercicio muy intenso, la cantidad de oxígeno es limitada de manera que la velocidad de glucolisis excede a la de respiración aerobia y el exceso de piruvato se convierte en lactato. El lactato se libera a la sangre, desde donde se distribuye al corazón para ser utilizado como combustible y a los tejidos gluconeogenéticos, como el hígado. Cuando las moléculas de lactato entran en la célula hepática se reoxidan a piruvato, que se utiliza para sintetizar glucosa a través de la gluconeogénesis (*véase* Figura 9.11). La glucosa vuelve al torrente sanguíneo desde donde llega de nuevo al músculo y a otras células.

El músculo esquelético es la principal fuente de lactato para la sangre y el hígado es el sitio principal de desarrollo de la gluconeogénesis, de forma que se establece un ciclo, que se muestra en la Figura 9A.2. El lactato producido por la glucolisis en las células musculares hipóxicas (deficitarias en oxígeno) se transporta a través de la sangre hasta el hígado. Allí, la gluconeogénesis convierte el lactato en glucosa que se libera luego a la sangre. Este proceso se conoce como ciclo de Cori, por Carl y Gerti Cori, que lo describieron en estudios realizados entre 1930 y 1940. La próxima vez que esté descansando después de un ejercicio intenso, piense en lo que está sucediendo: el lactato de sus células musculares se acaba de liberar a la sangre y está llegando a las células del hígado, donde se convierte de nuevo en glucosa. La razón por la cual usted respira agitadamente, es para proporcionar a su cuerpo el oxígeno necesario para que sus células musculares vuelvan a las condiciones aeróbicas y generen el ATP y el GTP necesario para la gluconeogénesis del hígado y para la síntesis de glucógeno de reserva.

La reserva de glucógeno es el tercer destino importante de la glucosa de la sangre. El glucógeno se almacena, fundamentalmente, en las células del hígado y del músculo. El glucógeno del músculo se usa como fuente de glucosa durante los periodos de ejercicio intenso. Por otra parte, cuando el hígado se estimula hormonalmente, libera la glucosa almacenada como glucógeno, con el fin de mantener los niveles de glucosa en sangre. El cuarto destino posible de la glucosa sanguínea es su uso para la síntesis de grasa corporal. La ruta de los ácidos grasos es vía

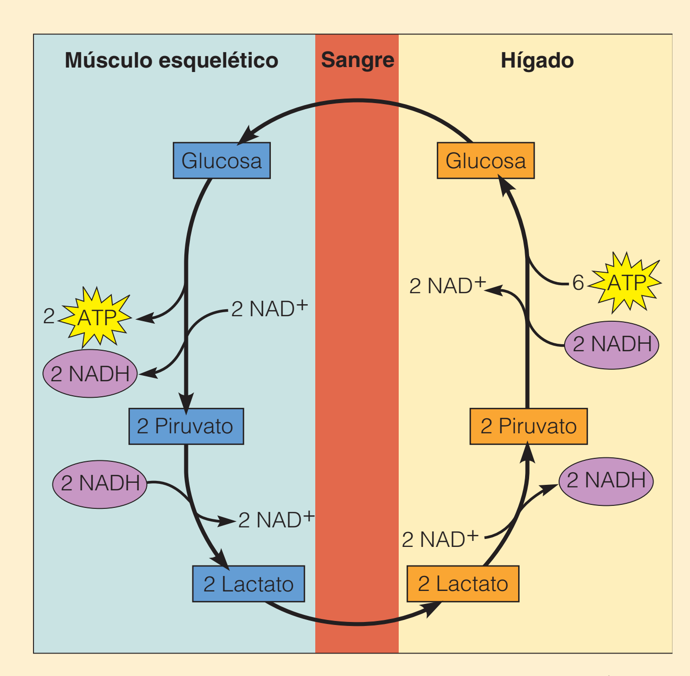


Figura 9A.2 El ciclo de Cori: el nexo entre la glucolisis del músculo y la gluconeogénesis del hígado. Las células del músculo esquelético derivan parte de la energía obtenida en la glucolisis, especialmente durante los periodos anaeróbicos de ejercicio intenso. El lactato así producido se transporta a través de la sangre hasta el hígado, donde es reoxidado a piruvato. El piruvato se utiliza como sustrato de la gluconeogénesis en el hígado, generando glucosa que se libera de nuevo a la sangre.

piruvato, a acetilCoA, como en la fase inicial de la respiración aerobia.

Cuando come más de lo que su cuerpo necesita como fuente de energía y para la biosíntesis de otras moléculas, el exceso de glucosa se oxida a aceltilCoA, que se utiliza para la síntesis de triacilgliceroles y se almacena como grasa corporal, especialmente en el tejido adiposo, que está especializado en esta función. Así, el cuerpo tiene siempre tres fuentes de energía: la glucosa de la sangre, el glucógeno del hígado y las células del músculo esquelético y los triacilgliceroles almacenados en el tejido adiposo.

Para concluir, volvamos a la pregunta inicial: ¿qué pasa con el azúcar? Toda la glucosa y otros azúcares del cuerpo proceden originalmente de los alimentos que consume —directamente como monosacáridos o de la ruptura de disacáridos y polisacáridos en su tracto intestinal—. El destino final de la glucosa es la oxidación a CO_2 y agua, que luego usted exhala y excreta. Pero al mismo, tiempo las moléculas de glucosa pueden estar circulando por su organismo a través de la sangre o ser almacenadas como glucógeno en el hígado o las células musculares. En su forma circulatoria, la glucosa puede ser oxidada rápidamente en los tejidos aeróbicos, como el cerebro, convertirse en lactato, entrar en el ciclo de Cori o utilizarse para sintetizar glucógeno o grasa.

Puede parecer sólo una modesta cucharada de azúcar para su café o cereales, pero trátela con respeto —¡desempeña un papel muy importante en el metabolismo energético de todas las células de su cuerpo!

En la Figura 9.14 se describen, con más detalle, las funciones reguladoras de PFK-2 y F2,6BP. La actividad de la PFK-2 depende del estado de fosforilación de una de sus subunidades. La actividad quinasa de esta enzima es alta cuando esa subunidad está en la forma desfosforilada y baja cuando está fosforilada. La fosforilación de PFK-2 por ATP está catalizada por una proteín-quinasa (Figura 9.14a). La actividad de esta enzima depende, por el contrario, del AMP cíclico (AMPc), que es un intermediario clave en muchas rutas de transducción de señales (*véase* Figura 14.6).

Además de la actividad PFK responsable de la fosforilación del F2,6BP, hay otra actividad enzimática, atribuida inicialmente a la que se denominó *fructosa-2,6-difosfatasa*, que elimina el grupo fosfato del F2,6BP, convirtiendo este compuesto de nuevo en fructosa-6-fosfato (*véase* Figura 9.14). Esta actividad también está regulada por fosforilación dependiente de cAMP, pero en este caso la fosforilación incrementa la actividad enzimática. Ahora sabemos que estas dos actividades —la quinasa que fosforila a la fructosa-6-fosfato y la fosfatasa que elimina el grupo fosfato— son en realidad propiedades de la misma enzima, PFK-2. Dado que la PFK-2 tiene dos actividades catalíticas, se denomina *enzima bifuncional*. Cuando la subunidad con el sitio de fosforilación está en la forma no fosforilada, la enzima bifuncional actúa como quinasa, dando lugar a la F2,6BP a partir de fructosa-6-fosfato (Figura 9.14b). Cuando la subunidad está fosforilada, la enzima tiene actividad fosfatasa, convirtiendo a la F2,6BP en fructosa-6-fosfato (Figura 9.14c).

Como vimos antes, la F2,6BP activa a la enzima glucolítica PDK-1 (Figura 9.14e). El cAMP, sin embargo, afecta a la concentración de F2,6BP de dos maneras: inhibe la actividad quinasa de la PFK-2 y estimula la actividad fosfatasa (F2,6Bpasa). Estos dos efectos tienden a disminuir la concentración de F2,6BP de la célula. Este cambio lleva a un descenso de la estimulación de PFK-1 y de la inhibición de la fructosa-1,6-difosfatasa y, por tanto, a una disminución del flujo glucolítico y un incremento del flujo gluconeogenético.

Los efectos del cAMP mostrados en la Figura 9.14 son importantes en la regulación hormonal porque el nivel de cAMP en las células hepáticas está bajo control de las hormonas glucagón y adrenalina (epinefrina). Estas hormonas producen un incremento de la concentración de cAMP que supone un estímulo para la gluconeogénesis. Es más, el incremento de la concentración de cAMP también estimula una cascada reguladora que aumenta la tasa de movilización del glucógeno (*véase* Figura 14.24). No es sorprendente, por tanto, que el efecto del cAMP sobre la síntesis de glucógeno sea el opuesto: cuando el glucagón o la epinefrina disparan el incremento de la concentración de cAMP, se produce una disminución de la tasa de formación del glucógeno. Para conocer más detalles de la regulación hormonal y el papel del cAMP en los efectos hormonales, véase la discusión sobre transducción de señales hormonales en el Capítulo 14.

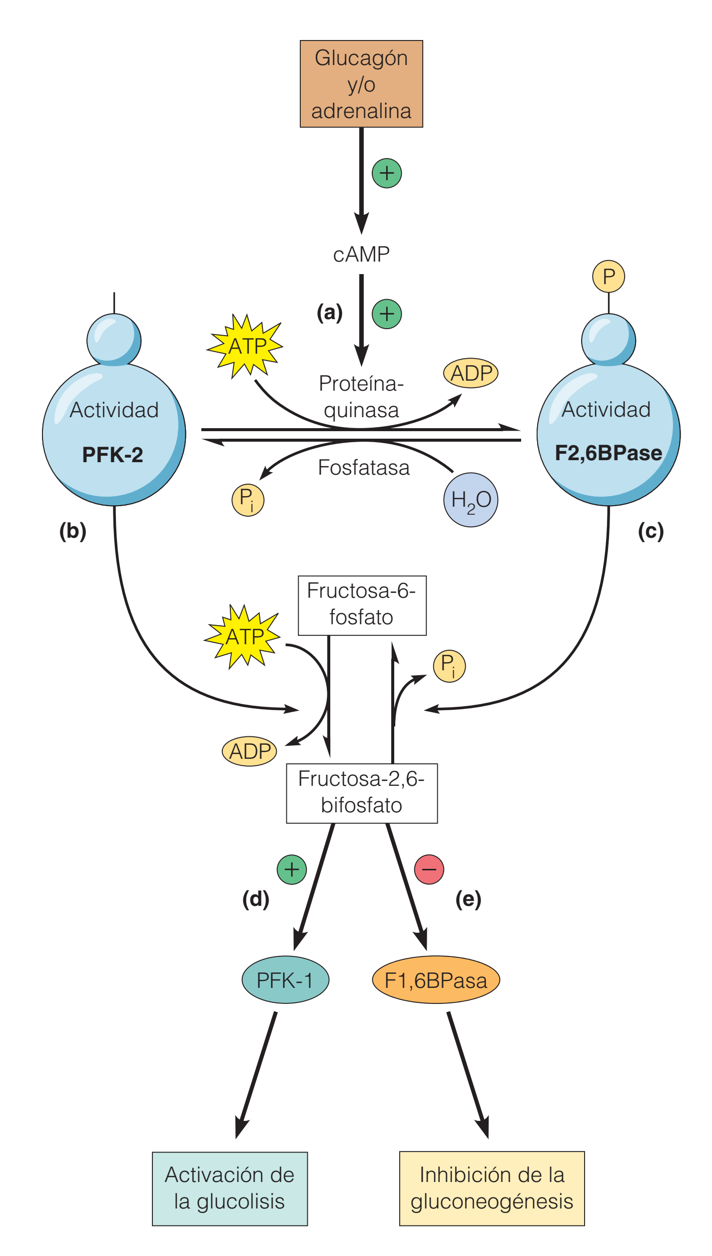


Figure 9.14 La fosfofructoquinasa-2 (PFK-2) es una enzima bifuncional con dos actividades catalíticas distintas. (**a**) PFK-2 se fosforila por una proteína quinasa cAMP-activada y se desfosforila por una fosfatasa. (**b**) En su forma desfosforilada, PFK-2 tiene actividad fosfofructoquinasa, provocando la catálisis de la fosfoliración de la fructosa-6-fosfato para formar fructosa-2,6-bisfosfato (F2,6BP).(**c**) En su forma fosforilada, la enzima actúa como una fosfatasa, catalizando la hidrólisis del grupo fosfato de átomo de carbono 2 de F2,6BP. F2,6BP es (**d**) un activador alostérico de la enzima glucolítica PFK-1 y (**e**) un inhibidor alostérico de la enzima gluconeogénica fructosa-1,6-bisfosfatasa. La regulación hormonal de cAMP por el glucagón y la adrenalina se muestra en la parte superior de la figura. El efecto de estas hormonas es aumentar el nivel de cAMP, simulando así la fosforilación de PFK-2 y convirtiéndola a la forma que tiene actividad fructosa-2,6-bisfosfatasa. La reducción resultante en la concentración de F2,6BP elimina la activación de la glucólisis y mitiga la inhibición de la gluconeogénesis.

Perspectiva

Las rutas metabólicas en las células suelen ser anabólicas (de síntesis) o catabólicas (de degradación). Más tarde veremos que las rutas pueden describirse también como anfibólicas, una combinación de esas dos reacciones en las que los productos procedentes del catabolismo se pueden usar después en reacciones anabólicas de síntesis. Las reacciones catabólicas proporcionan la energía necesaria para que puedan producirse las reacciones anabólicas. El ATP es un intermediario útil para esto, porque su enlace anhídrido tiene una energía libre de hidrólisis, que permite al ATP funcionar como donador y al ADP como aceptor, de grupos fosfato. La mayoría de los quimiotrofos obtienen la energía necesaria para la síntesis de ATP del catabolismo de nutrientes orgánicos, como carbohidratos, grasas y proteínas. Lo consiguen por medio de procesos fermentativos en ausencia de oxígeno o por metabolismo respiratorio, que suele ser, aunque no siempre, un proceso aerobio.

Usando la glucosa como prototipo de sustrato, el catabolismo, tanto en condiciones aeróbicas, como anaeróbicas empieza con la glucolisis, una ruta de diez pasos que convierte la glucosa en piruvato. En la mayoría de los casos, mediante este proceso se producen dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa. En ausencia de oxígeno, la coenzima reducida NADH generada durante la glucolisis se debe reoxidar a expensas del piruvato, generando los productos finales típicos de la fermentación, como lactato o etanol y dióxido de carbono. Esto limita significativamente la cantidad de energía libre que puede liberarse de la glucosa, pero aproximadamente el 7% se puede conservar bastante eficientemente en forma de ATP. Aunque la glucolisis suele describirse con la glucosa como sustrato inicial, la secuencia glucolítica también es la ruta principal para el catabolismo de otros azúcares relacionados, así como para la utilización de la glucosa-1-fosfato derivada del procesamiento fosforolítico de polisacáridos de reserva como el almidón y el glucógeno.

La gluconeogénesis es, en cierto modo, el opuesto a la glucolisis porque las células sintetizan, mediante esta ruta, la glucosa (y otros carbohidratos) a partir de moléculas iniciales no hidrocarbonadas de tres y cuatro carbonos, como el piruvato. Sin embargo, la ruta gluconeogénica no es exactamente la inversa de la glucolisis. Las dos rutas tienen siete reacciones enzimáticas en común pero las tres reacciones más exergónicas de la glucolisis se evitan en la gluconeogénesis por reacciones que dirigen la ruta exergónica en el sentido de la gluconeogénesis por el aporte energético de ATP y GTP.

Como otras rutas metabólicas, la glucolisis y la gluconeogénesis están fuertemente reguladas para asegurar que la tasa de formación de productos (ATP y glucosa, respectivamente) se ajuste a las necesidades celulares. Las enzimas que están sujetas a regulación alostérica, catalizan reacciones únicas en sus rutas. Estas enzimas están reguladas por uno o más efectores, que incluyen al ATP, el ADP y el AMP, así como a la acetilCoA y el citrato, intermediarios clave en la respiración aerobia. En células animales y vegetales, el regulador alostérico más importante, tanto de la glucolisis como de la gluconeogénesis, es la fructosa-2,6-difosfato. Su concentración depende de las actividades quinasa y fosforilasa relativas de la enzima bifuncional PFK-2. La función de la PFK-2 está asimismo regulada por las hormonas glucagón y adrenalina, mediada por la concentración intracelular de AMP cíclico.

Aunque la glucolisis puede parecer compleja a primera vista, representa el mecanismo más sencillo por el que se puede degradar la glucosa en disolución a temperaturas compatibles con la vida y con un gran rendimiento de energía libre, conservada como ATP. Acoplada a una secuencia de reacciones de reducción adecuada para regenerar la coenzima NAD^+, la glucolisis puede llevarse a cabo en condiciones anaeróbicas, proporcionando energía a pesar de la ausencia de oxígeno. Pero todo lo visto hasta ahora, sin embargo, no es nada comparado con el potencial de liberación y conservación de energía que se da en presencia de oxígeno. Más adelante, veremos que la respiración aerobia es el pilar de la bioenergética y la base del metabolismo energético celular para la mayoría de las formas de vida quimiotrofas. Por ello, nos quedaremos con el NADH y el piruvato producidos en la glucolisis y los llevaremos a la respiración aerobia, el tema del Capítulo 10.

Problemas

Los problemas de mayor dificultad están marcados con un •.

9.1 Enlaces de alta energía. Enlaces de alta energía. Cuando el término «enlace de alta energía» fue introducido por primera vez por Fritz Lipmann en 1941, se consideró un concepto útil para describir la energética de las moléculas y reacciones bioquímicas. Sin embargo, el término puede dar lugar a confusión a la hora de relacionar ideas sobre el metabolismo de la energía celular y la química física. Para evaluar su propio conocimiento indique si cada una de las siguientes afirmaciones es verdadera (V) o falsa (F). Si es falsa, enúnciela en la forma correcta.

(a) La energía se almacena en enlaces especiales de alta energía de moléculas como el ATP y se libera cuando se rompen estos enlaces.

(b) Siempre se libera energía cuando se forma un enlace covalente y se requiere siempre para romperlo.

(c) Para un químico-físico, enlace de alta energía es un enlace muy estable cuya ruptura requiere mucha energía,

mientras que para un bioquímico el término se refiere más bien a un enlace cuya hidrólisis libera mucha energía.

(d) El fosfato terminal del ATP es un fosfato de alta energía que se lleva esa energía cuando se hidroliza.

(e) Los enlaces fosfoéster son enlaces de baja energía porque su ruptura requiere menos energía que la de los enlaces de alta energía de los fosfoanhídridos.

(f) El término «molécula de alta energía» debe entenderse como una característica de la reacción en la que la molécula está implicada y no como una propiedad intrínseca de un enlace particular de la molécula.

9.2 La historia de la glucolisis. A continuación se exponen varias observaciones históricas que contribuyeron a la descripción de la ruta glucolítica. En cada caso, sugiera una base metabólica para el efecto observado y explique el significado de la observación para la descripción de la ruta.

(a) La fermentación alcohólica en los extractos de levadura requiere una fracción termosensible denominada originalmente *zimasa* y una fracción termoestable necesaria para la actividad zimasa.

(b) La fermentación alcohólica no tiene lugar en ausencia de fosfato inorgánico.

(c) En presencia de yodoacetato, un conocido inhibidor de la glucolisis, los extractos de levadura fermentativos acumulan una hexosa doblemente fosforilada.

(d) En presencia de iones flúor, otro conocido inhibidor, los extractos de levadura fermentativos acumulan dos ácidos tricarbonados fosforilados.

9.3 La glucolisis en 25 palabras o menos. Complete cada una de las siguientes afirmaciones sobre la ruta glucolítica en 25 palabras o menos.

(a) Aunque el cerebro es un órgano estrictamente aeróbico, depende de la glucolisis porque…

(b) Aunque una de sus reacciones es una oxidación, la glucolisis puede darse en ausencia de oxígeno porque…

(c) El destino del piruvato generado en la glucolisis depende de…

(d) Si cocemos pan o elaboramos cerveza, dependemos de la glucolisis para…

(e) Hay dos órganos en su organismo que pueden utilizar lactato para…

(f) La síntesis de glucosa a partir de lactato en las células hepáticas requiere más moléculas de nucleósidos trifosfato (ATP y GTP) de las que se forman durante el catabolismo de la glucosa a lactato en la célula muscular porque…

9.4 Energética de la utilización de carbohidratos. La fermentación anaeróbica de la glucosa libre tiene un rendimiento de 2 moléculas de ATP por molécula de glucosa. Para las unidades de glucosa de la molécula de glucógeno, el rendimiento es de 3 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa. El valor correspondiente para el disacárido sacarosa es 2 moléculas de ATP por cada molécula de monosacárido, si la sacarosa la ingiere un animal, pero 2,5 moléculas de ATP si es metabolizado por una bacteria.

(a) Explique por qué las unidades de glucosa presentes en el glucógeno tienen un rendimiento de ATP mayor que el de las unidades de glucosa libre.

(b) ¿Cuál es el mecanismo más probable para explicar el rendimiento energético de 2 moléculas de ATP por molécula de monosacárido en la digestión intestinal de la sacarosa?

(c) Basándose en lo que sabe del procesamiento del glucógeno, sugiera un mecanismo para el metabolismo bacteriano de la sacarosa que esté de acuerdo con un rendimiento energético de 2,5 moléculas de ATP por molécula de monosacárido.

(d) ¿Qué rendimiento energético (en moléculas de ATP por molécula de monosacárido) predeciría para el catabolismo bacteriano del trisacárido rafinosa?

9.5 La fosforilación de la glucosa. La fosforilación directa de la glucosa por fosfato inorgánico es una reacción termodinámicamente desfavorable:

$$\text{Glucosa} + P_i \longrightarrow \text{glucosa-6-fosfato} + H_2O \qquad \Delta G°' = +3{,}3 \text{ kcal/mol} \qquad \textbf{(9.21)}$$

En la célula, la fosforilación de la glucosa se lleva a cabo por acoplamiento de esta reacción a la hidrólisis de ATP, una reacción altamente exergónica:

$$\text{ATP} + H_2O \longrightarrow \text{ADP} + P_i \qquad \Delta G°' = -7{,}3 \text{ kcal/mol} \qquad \textbf{(9.22)}$$

Las concentraciones típicas de estos intermediarios en las levaduras son las siguientes:

[glucosa-6-fosfato] = 0,08 mM [ATP] = 1,8 m*M*
[Pi] = 1,0 mM [ADP] = 0,15 m*M*

Asuma una temperatura de 25 °C para todos los cálculos.

(a) ¿Qué concentración mínima de glucosa debe mantenerse en las levaduras para que la fosforilación directa (Reacción 9.21) sea termodinámicamente espontánea? ¿Es fisiológicamente razonable? Explique su razonamiento.

(b) ¿Cuál es la ecuación global para la fosforilación acoplada (ATP dependiente) de la glucosa? ¿Cuál es su valor de $\Delta G°'$?

(c) ¿Qué concentración mínima de glucosa debe mantenerse en las levaduras para que la reacción acoplada sea termodinámicamente espontánea? ¿Es fisiológicamente razonable?

(d) ¿De cuántos órdenes de magnitud es aproximadamente la mínima concentración requerida de glucosa reducida cuando su fosforilación está acoplada a la hidrólisis de ATP?

(e) Asumiendo que las levaduras tienen una concentración de glucosa de 5,0 m*M*, ¿cuál es la $\Delta G'$ para la reacción de fosforilación acoplada?

9.6 Intoxicación por etanol y toxicidad del metanol. En este capítulo se ha mencionado la enzima alcohol deshidrogenasa por su papel en el paso final de la fermentación. Sin embargo, esta enzima es común en organismos aerobios, incluyendo a los humanos. La capacidad del cuerpo humano de catabolizar el etanol de las bebidas alcohólicas depende de la presencia de la enzima alcohol deshidrogenasa en las células del hígado. Uno de

los efectos de la intoxicación por etanol es un dramático descenso de la concentración de NAD^+ en los hepatocitos, lo que supone un descenso de la utilización aeróbica de la glucosa. El metanol, por otra parte, no es estrictamente tóxico; es un veneno mortal debido al efecto tóxico del formaldehído en el que se convierte cuando llega al hígado.

(a) ¿Qué hace que el consumo de etanol suponga una reducción de la concentración de NAD^+ y un descenso de la tasa de respiración aerobia?

(b) La mayoría de los efectos desagradables de una resaca se deben a la acumulación de acetaldehído y de sus metabolitos. ¿De dónde procede el acetaldehído?

(c) El tratamiento médico para el envenenamiento por metanol normalmente supone la administración de una gran dosis de etanol. ¿Por qué es eficaz este tratamiento?

•9.7 Fermentación del propionato. Auque el lactato y el etanol son los productos más conocidos de la fermentación, se conocen otras rutas fermentativas, algunas de ellas con importantes aplicaciones comerciales. La producción de queso suizo, por ejemplo, depende de la bacteria *Propionibacterium freudenreichii*, que convierte al piruvato en propionato ($CH_3-CH2-COO^-$). La fermentación de glucosa a propionato siempre genera al menos algún otro producto.

(a) ¿Por qué no es posible idear un esquema para la fermentación de la glucosa en la que el propionato sea el único producto final?

(b) Sugiera un esquema general para la producción de propionato que genere sólo un producto final adicional e indique cuál puede ser ese producto.

(c) Si sabe que la producción de queso suizo requiere propionato y dióxido de carbono y que ambos se producen por la fermentación de *Propionibacterium*, ¿qué más puede decir ahora sobre el proceso fermentativo que lleva a cabo esta bacteria?

9.8 Metabolismo de la galactosa. La ruta glucolítica suele describirse con la glucosa como sustrato inicial, porque es el azúcar sencillo más importante para la mayor parte de los organismos. Sin embargo, las células pueden utilizar otros azúcares. La dieta de un animal joven, por ejemplo, consta casi exclusivamente de leche, que contiene como principal carbohidrato al disacárido lactosa. Cuando se hidroliza la lactosa en el intestino se genera una molécula de glucosa y otra de galactosa, que las células de estos animales (y bebés humanos) metabolizan como tal. La galactosa se metaboliza por fosforilación y conversión en glucosa. La secuencia de reacciones es algo complicada porque la conversión a glucosa (una reacción de epimerización en el carbono 4) sucede mientras el azúcar se une al transportador uridina difosfato (UDP), un compuesto parecido al ADP. Las reacciones son las siguientes:

$$\text{galactosa} + \text{ATP} \longrightarrow \text{galactosa-1-fosfato} + \text{ADP} \quad \textbf{(9.23)}$$

$$\text{galactosa-1-fosfato} + \text{UDP-glucosa} \longrightarrow \text{glucosa-1-fosfato} + \text{UDP-galactosa} \quad \textbf{(9.24)}$$

$$\text{UDP-galactosa} \longrightarrow \text{UDP glucosa} \quad \textbf{(9.25)}$$

$$\text{glucosa-1-fosfato} \longrightarrow \text{glucosa-6-fosfato} \quad \textbf{(9.26)}$$

(a) Formule la reacción para la conversión global de galactosa en glucosa-6-fosfato.

(b) Cree que el valor de $\Delta G°'$ para la reacción global de una parte es comparable a la reacción de la hexoquinasa (reacción Gly-1)?

(c) Sabiendo que la reacción de la epimerasa (Reacción 9.25) tiene una dependencia absoluta de la coenzima NAD^+ e implica a la 4-cetoglucosa como intermediario de unión a la enzima, ¿puede sugerir una secuencia de reacciones que explique la conversión de galactosa en glucosa? (Use las proyecciones de Haworth en este caso.)

(d) Hay una forma de la galactosemia congénita causada por la ausencia genética de la enzima, que cataliza la Reacción 9.24. Se cree que los síntomas de la galactosemia, que incluyen deficiencia mental y cataratas, son consecuencia de los altos niveles de galactosa en sangre y de una acumulación intracelular de galactosa-1-fosfato. ¿Por qué es ésta una hipótesis razonable?

(e) Se conoce al menos otra forma de galactosemia, causada también por la ausencia genética de una enzima específica. ¿Cuál cree que es esa enzima? Explique su razonamiento.

9.9 Glucolisis y Gluconeogénesis. Como indica la Figura 9.12, la gluconeogénesis está constituida por lo que es, esencialmente, la ruta reversa de la glucolisis pero con ciertas variaciones, que tienen lugar en la primera, tercera y décima reacciones de la glucolisis.

(a) Explique por qué no es posible que se dé la gluconeogénesis simplemente mediante las reacciones reversas de la glucolisis.

(b) Formule la ecuación general de la gluconeogénesis, que es comparable a la Reacción 9.16 de la glucolisis.

(c) Explique por qué la gluconeogénesis requiere seis moléculas de núcleosido trifosfato (cuatro ATPs y dos GTPs) por molécula de glucosa sintetizada, mientras la glucolisis sólo rinde dos moléculas de ATP por molécula de glucosa.

(d) Asumiendo concentraciones de ATP, ADP y Pi tales que la $\Delta G'$ sea de alrededor de –10 kcal/mol, ¿cuál es, aproximadamente, el valor de $\Delta G'$ para la reacción global de la gluconeogénesis que usted formuló en el apartado b?

(e) Con todas las enzimas de la glucolisis y de la gluconeogénesis presentes en una célula hepática, ¿qué es lo que hace a la célula «saber» si la glucosa debe ser catalizada o sintetizada en un momento dado?

•9.10 Tripanosomas, glucosomas y la compartimentación de la glucolisis. En la mayoría de los organismos, todas las reacciones glucolíticas suceden en el citosol. Sin embargo, en ciertos protozoos parásitos conocidos como *tripanosomas*, las enzimas que catalizan los primeros siete pasos de la glucolisis están compartimentados en orgánulos delimitados por membranas denominados *glucosomas*.

(a) ¿Cuál fue la principal evidencia experimental que condujo al descubrimiento de siete de las diez enzimas glucolíticas localizadas en un orgánulo en lugar de en el citosol?

(b) ¿En qué cree que beneficia a los tripanosomas esta compartimentación de la glucolisis?

(c) ¿Qué proteínas específicas de transporte predice que estén presentes en la membrana glucosomal? Explíquelo.

(d) Los glucosomas suelen considerarse un tipo especial de peroxisomas. ¿Qué otras enzimas esperaría encontrar, por tanto, en estos orgánulos? Razónelo.

•9.11 Tiene algo que explicar. Explique cada una de las siguientes observaciones:

(a) En sus estudios clásicos de la fermentación de la glucosa en levaduras, Louis Pasteur observó que la tasa de consumo de glucosa era mucho mayor en condiciones anaeróbicas que en condiciones aeróbicas.

(b) En 1905, Arthur Harden y William Young encontraron que la adición de fosfato inorgánico al extracto de levadura estimulaba y prolongaba la fermentación de la glucosa.

(c) Los cocodrilos son normalmente muy lentos pero capaces de efectuar movimientos muy rápidos de patas, mandíbulas y cola si son provocados. Sin embargo, estos arranques de actividad deben ir seguidos de largos periodos de recuperación.

(e) La fermentación de la glucosa a lactato es un proceso en el que se produce energía a pesar de que no implica una oxidación neta (es decir, incluso aunque la oxidación de gliceraldehído-3-fosfato a glicerato esté acompañada de una reducción del piruvato a lactato y no se dé una acumulación neta de NADH).

•9.12 Envenenamiento por arsénico. El arsénico ($HAsO_4^{2-}$) es un veneno muy potente para casi todos los sistemas vivos. Entre otros efectos, se sabe que el arsénico desacopla la fosforilación de la oxidación del gliceraldehído-3-fosfato. Este desacoplamiento se da porque la enzima implicada, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, puede utilizar arsénico en lugar de fosfato inorgánico, formando glicerato-1-arseno-3-fosfato. Este producto es un compuesto altamente inestable que inmediatamente sufre una hidrólisis no enzimática dando lugar a glicerato-3-fosfato y arsénico libre.

(a) ¿En qué sentido se puede denominar al arsénico *desacoplador* de la fosforilación a nivel de sustrato?

(b) ¿Por qué es el arsénico tan tóxico para un organismo que depende de forma crítica de la glucolisis para obtener energía?

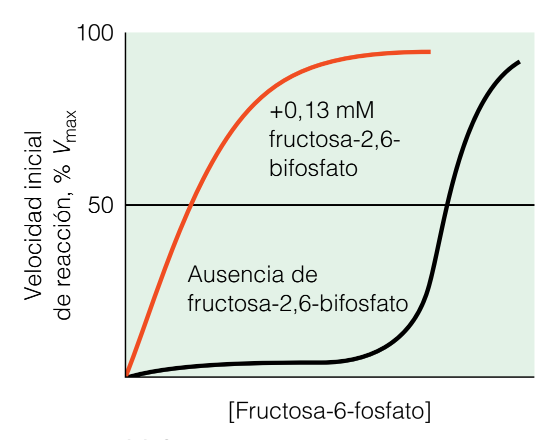
(c) ¿Se le ocurren otras reacciones que puedan ser desacopladas por el arsénico de la misma forma que sucede con la reacción de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa?

9.13 Regulación de la fosfofrutoquinasa-1. En la Figura 9.15 se muestran gráficas de la velocidad inicial de reacción (expresada como % de V_{max}) frente a la concentración de fructosa-6-fosfato para la fosfofructoquinasa PFK-1 en presencia y ausencia de fructosa-2,6-difosfato (F2,6BP) (Figura 9.15a) y en presencia de una alta o baja concentración de ATP (Figura 9.15b).

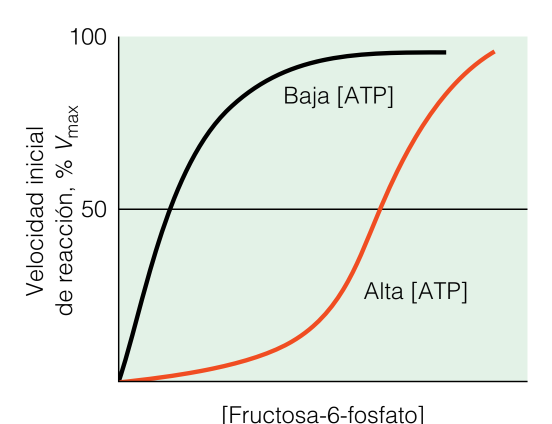
(a) Explique el efecto de F2,6BP en la actividad enzimática que se muestra en la Figura 9.15a.

(b) Explique el efecto de la concentración de ATP en los datos de la Figura 9.15b.

(c) ¿Qué debe asumir sobre la concentración de ATP de la Figura 9.15a y sobre la concentración de F2,6BP en la Figura 9.15b? Razónelo.



(a) Cinética de PFK-1 en presencia o ausencia de F2,6BP



(b) Cinética de PFK-1 en presencia de alta o baja concentración de ATP

Figura 9.15 Regulación alostérica de la fosfofructoquinasa-1. Aquí se muestran las representaciones de Michaelis-Menten de la actividad de la fosfofructoquinasa (PFK-1), indicando (**a**) la dependencia de la velocidad inicial en la concentración del sustrato fructosa-6-fosfato, en presencia (línea roja) o ausencia (línea negra) de fructosa-2,6-difosfato, y (**b**) la dependencia en la velocidad inicial de la concentración de fructosa-6-fosfato a alta (línea roja) o baja (línea negra) concentración de ATP. En ambos casos, la la velocidad de reacción inicial se expresa como porcentaje de V_{max}, la velocidad máxima. *Véase* el Problema 9.13.

Bibliografía recomendada

Las referencias con importancia histórica están marcadas con •.

Referencias generales

Berg, J. M., J. L. Tymoczko y L. Stryer. *Biochemistry,* 5th ed. New York: W. H .Freeman, 2002.

Canback, B., S. G. E. Andersson y C. G. Kurland. The global phylogeny of glycolytic enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002): 6097.

Lehninger, A. L., D. L. Nelson y M. M. Cox. *Principles of Biochemistry,* 3rd ed. New York: Worth, 1999.

Mathews, C. K. y K. E. van Holde. *Biochemistry,* 2nd ed. Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings, 1996.

Metzler, D.E. *Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells.* 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2001.

Generación de ATP y ADP

•Hinkle, P. C. y R. E. McCarty. How cells make ATP. *Sci. Amer.* 238 (March 1978): 104.

•Lipmann, F. *Wanderings of a Biochemist.* New York: Wiley, 1971.

Wang, P., Z. Guan y S. Saraswati. A *Drosophila* temperature-sensitive seizure mutant in phosphoglycerate kinase disrupts ATP generation and alters synaptic function. *J. Neurosci.* 24 (2004): 4518.

•Westheimer, F. Why nature chose phosphates. *Science* 235 (1987): 1173.

Glucolisis y fermentación

Boels, I. C., M. Kleerebezem y W. M. de Vos. Engineering of carbon distribution between glycolysis and sugar nucleotide biosynthesis in *Lactococcus lactis. Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003): 1129.

Flores, C. L., C. Rodriguez, T. Petit y C. Gancedo. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 24 (2000): 507.

Giege, P., J. L. Heazlewood y U. Roessner-Tunali. Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in *Arabidopsis* cells. *Plant Cell* 15 (2003): 2140.

Goncalves, P. y R. J. Planta. Starting up yeast glycolysis. *Trends Microbiol.* 6 (1998): 314.

Teusink, B., J. Passarge y C. A. Reijenga. Can yeast glycolysis be understood in terms of in vitro kinetics of the constituent enzymes? Testing biochemistry. *Eur. J. Biochem* 267 (2000): 5313.

Gluconeogénesis

Battezzati, A., A. Caumo y F. Martino. Nonhepatic glucose production in humans. *Amer. J. Physiol.* 286 (2004): E129.

Brosnan, J. T. Comments on metabolic needs for glucose and the role of gluconeogenesis. *Eur. J. Clin. Nutr.* 53 (1999): 107.

Dobson, G. P., S. Hitchins y W. E. Teague, Jr. Thermodynamics of the pyruvate kinase reaction and the reversal of glycolysis in heart and skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 277 (2002): 27176.

Kalhan, S. C., P. Parima y R. van Beek. Estimation of gluconeogenesis in newborn infants. *Amer. J. Physiol.* 281 (2001): E991.

Previs, S. F. y H. Brunengraber. Methods for measuring gluconeogenesis in vivo. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metabol. Care* 1 (1998): 461.

Regulación de la glucolisis y gluconeogénesis

Barthel, A. y D. Schmoll. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Amer. J. Physiol.* 285 (2003): E685.

Boden, G. Effects of free fatty acids on gluconeogenesis and glycogenolysis. *Life Sciences* 72 (2003): 977.

Corssmit, E. P., J. A. Romijn y H. P. Sauerwein. Regulation of glucose production with special attention to nonclassical regulatory mechanisms. *Metabolism: Clin. Exper.* 50 (2001): 742.

Even, S., M. Cocaign-Bousquet y N. D. Lindley. Transcriptional, translational and metabolic regulation of glycolysis in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG 1363 grown in continuous acidic cultures. *Microbiol.* 149 (2003): 1935.

Hardie, D. G., D. Carling y M. Carlson. The AMP-activated/SNF 1 protein kinase superfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998): 821.

Koebmann, B. J., J. L. Snoep y H. Westerhoff. The glycolytic flux in *Escherichia coli* Is controlled by the demand for ATP. *J. Bacteriol.* 184 (2002): 3909.

Nordlie, R. C., J. D. Foster y A. J. Lange. Regulation of glucose production by the liver. *Annu. Rev. Nutr.* 19 (1999): 379.

Plaxton, W. C. The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47 (1996): 185.

Webster, K. A. Evolution of the coordinate regulation of glycolytic enzyme genes by hypoxia. *J. Exp. Biol.* 206 (2003): 2911.



10

Metabolismo quimiótrofo de la energía: respiración aerobia

En el capítulo anterior hemos aprendido que algunas células satisfacen sus requisitos energéticos mediante la fermentación aeróbica, bien porque sean anaerobias estrictas o bien porque sean células anaerobias facultativas, capaces de funcionar en situaciones de ausencia o escasez de oxígeno. Sin embargo, también hemos visto que la fermentación produce únicamente cantidades limitadas de energía. En ausencia de un aceptor de electrones externo —uno que no forma parte por sí mismo de la ruta glucolítica— los electrones que se liberan de un compuesto orgánico de tres carbonos (gliceraldehído-3-fosfato) se transfieren al final a otro compuesto de tres carbonos (piruvato), y la diferencia de energía es tal que sólo se generan dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa.

En resumen, la fermentación puede satisfacer los requisitos energéticos de una célula, pero el rendimiento de ATP es bajo, porque la célula sólo tiene acceso a una parte limitada de la energía libre potencialmente disponible de las moléculas oxidables, que usa como sustratos. Además, la fermentación tiene a menudo como consecuencia, la acumulación de productos de desecho como el etanol o el lactato, que si se acumulan, son tóxicos para la célula, a no ser, claro está, que sean excretados por la célula y metabolizados posteriormente en otro lugar del organismo.

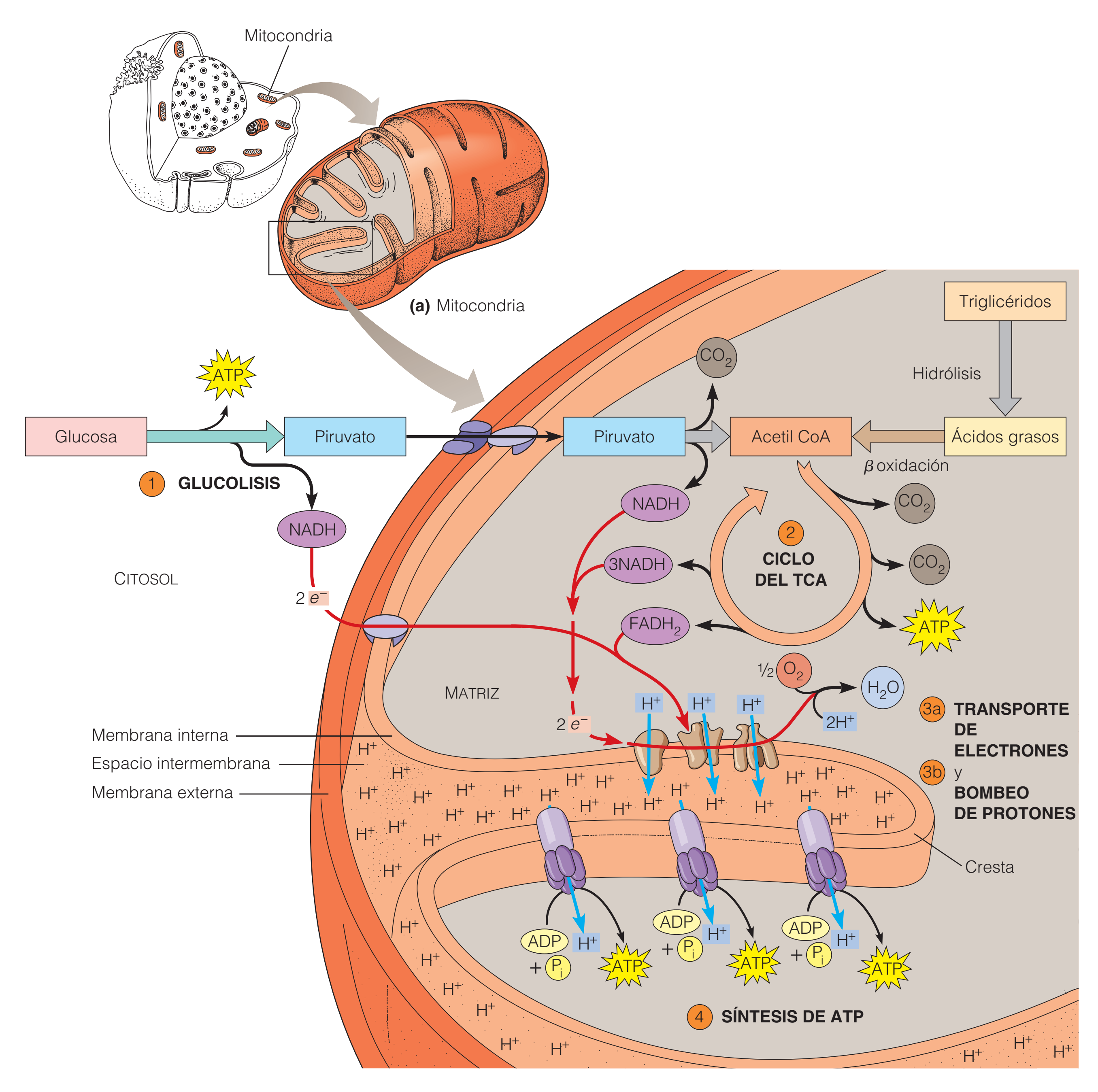
Respiración celular: maximizando el rendimiento del ATP

Todo esto cambia dramáticamente cuando se trata de la **respiración celular,** o para abreviar, *respiración*. Cuando se dispone de un aceptor de electrones externo, se puede dar la oxidación completa del sustrato, obteniéndose más ATP. Se entiende como *respiración celular, el flujo de electrones en o a través de una membrana, desde coenzimas reducidas hasta un aceptor de electrones, normalmente acompañado de la producción de ATP*. Posteriormente abordaremos el significado de «membrana» y de «producción de ATP» de esta definición. Por ahora, centrémonos en las coenzimas reductoras y los aceptores de electrones. Ya hemos visto que la coenzima reducida que se genera por el catabolismo glucolítico de los azúcares o compuestos relacionados es el NADH. Como veremos a continuación, otras dos coenzimas, *FAD (dinucleótido de adenina y flavina)* y *coenzima Q* (o *ubiquinona*), también recogen los electrones, que se liberan desde compuestos orgánicos oxidables y los transfieren al aceptor final de electrones, a través de una serie de transportadores electrónicos.

Para muchos organismos, incluyendo al autor y los lectores de este libro, el aceptor final de electrones es el *oxígeno*, la forma reducida de este aceptor es el *agua*, y se conoce al proceso en su conjunto como **respiración aerobia**. Mientras que la gran mayoría de los quimiótrofos en la Tierra llevan a cabo la respiración aerobia, existen varios aceptores finales de electrones que son usados por otros organismos, especialmente por las bacterias. Algunos ejemplos de estos aceptores alternativos y de sus formas reducidas son el azufre (S/H_2S), los protones (H^+/H_2) y los iones de hierro (Fe^{3+}/Fe^{2+}). Los procesos respiratorios que incluyen aceptores de electrones como éstos, no necesitan el oxígeno molecular y son, por tanto, ejemplos de **respiración anaerobia**. La respiración anaerobia desempeña un papel importante en los ciclos ambientales de elementos como el azufre, el hidrógeno y el hierro, y contribuyen significativamente a la economía energética de la biosfera. Nosotros, sin embargo, nos centraremos aquí en la respira-

ción aerobia porque representa la fuente principal del metabolismo energético en el mundo aeróbico del que somos parte nosotros y otros organismos superiores.

Pondremos especial atención en la mitocondria (Figura 10.1) porque la mayor parte de la producción aeróbica de ATP tiene lugar dentro de este orgánulo.



(b) Localización de la respiración aerobia dentro de la mitocondria

Figura 10.1 **Papel de la mitocondria en la respiración aerobia.** (**a**) La mitocondria desempeña un papel central en la respiración aerobia; la mayor parte de la producción de ATP de la respiración en las células eucariotas ocurre en este orgánulo. (**b**) La oxidación de la glucosa y de otros azúcares comienza en el citosol con la glucolisis (etapa 1), produciéndose piruvato. El piruvato se transporta a través de la membrana mitocondrial interna y se oxida dentro de la matriz a Acetil CoA, el primer sustrato del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) (etapa 2). El Acetil CoA se puede formar también por la *β*-oxidación de los ácidos grasos. El transporte de electrones (etapa 3a) está acoplado a un bombeo de protones (etapa 3b), conservándose la energía del transporte de electrones como un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana interna de la mitocondria (o de la membrana plasmática, en el caso de los procariotas). La energía del gradiente de protones se usa, en parte, para la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (etapa 4).

La respiración aerobia produce mucha más energía que la fermentación

Con el oxígeno como último aceptor de electrones, podemos empezar desde el piruvato generado por la glucolisis y preguntarnos cómo se cataboliza el piruvato y cómo se conserva la energía libre producida en el proceso, mediante la producción de ATP. Como ya sabemos por el Capítulo 9, los productos terminales de la respiración aerobia son el dióxido de carbono y el agua (*véase* Reacción 9.12). Éstas son las mismas moléculas con las que comienza la fotosíntesis, exigencia del flujo cíclico de materia entre el mundo quimiotrópico y el fototrópico. Por otra parte, el rendimiento energético de la respiración aerobia es considerablemente mayor que el de la fermentación. En vez de dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa, la respiración aerobia puede producir potencialmente hasta 38 moléculas de ATP por molécula de glucosa en procariotas, y entre 36 y 38 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa en eurocariotas, dependiendo del tipo celular.

El oxígeno hace posible todo esto sirviendo como el aceptor terminal de electrones, y proporcionando un modo de reoxidación continua del NADH y de otras coenzimas reducidas. Estas moléculas aceptan electrones durante la oxidación posterior de intermediarios orgánicos derivados del piruvato u otros sustratos oxidables. Transfieren después estos electrones al oxígeno por medio de una secuencia de transportadores de electrones unidos a membrana. De esta manera, la respiración aerobia incluye, tanto rutas de oxidación en las que se liberan los electrones de sustratos orgánicos y transferidos a coenzimas transportadores, como procesos concomitantes en los que las coenzimas reducidas (portadoras de electrones) son reoxidadas por el transporte de electrones al oxígeno, con la producción indirecta de ATP.

La respiración incluye la glucolisis, el ciclo del TCA, el transporte de electrones y la síntesis de ATP

Consideraremos la respiración aerobia en cuatro etapas, dos que se refieren a los procesos oxidativos mediados por coenzimas y otros dos, que incluyen la reoxidación de las coenzimas y la producción de ATP. Estas etapas se muestran en la Figura 10.1b. En la célula, por supuesto, todos estos procesos ocurren continuamente y al mismo tiempo. Su división en cuatro etapas arbitrarias puede ser útil para su discusión, pero tenga en cuenta que ninguna de estas etapas funciona aisladamente; cada una es una parte integral del proceso respiratorio general.

La etapa 1 es la *ruta glucolítica* que hemos tratado en el Capítulo 9. La glucolisis tiene el mismo resultado en condiciones aeróbicas y anaeróbicas: la oxidación de la glucosa a piruvato. Pero el destino del piruvato es diferente en presencia de oxígeno (*véase* Figura 9.8). En lugar de servir de aceptor de electrones como en la fermentación, el piruvato es oxidado posteriormente a un compuesto denominado *acetil coenzima A (acetil CoA)*, que entra en la etapa 2, el *ciclo del ácido tricarboxílico (TCA)*. Esta ruta cíclica oxida completamente los carbonos entrantes a CO_2 y conserva la energía en forma de coenzimas reducidas, que son, en sí mismos, compuestos ricos en energía.

La etapa 3 consiste en el *transporte de electrones*, es decir, la transferencia de electrones desde coenzimas reducidas hasta el oxígeno, acoplado a un *transporte activo*, o *bombeo*, de protones a través de una membrana. La transferencia de electrones desde las coenzimas hasta el oxígeno es un proceso exergónico y aporta la energía que dirige el bombeo de electrones a través de la membrana en la que están embebidos los transportadores, generando un *gradiente electroquímico de protones* a ambos lados de la membrana. En la etapa 4, la energía de este gradiente de protones se usa para impulsar la síntesis de ATP. Este modelo de síntesis de ATP dependiente de oxígeno se denomina *fosforilación oxidativa.*

Nuestro objetivo en este capítulo es comprender los procesos señalados como etapas 2, 3 y 4 en la Figura 10.1b. En particular, queremos examinar (1) qué ocurre con el piruvato (y otros sustratos oxidables como los lípidos y los aminoácidos) en situaciones aeróbicas; (2) cómo median las coenzimas y otros transportadores de electrones la transferencia exergónica de electrones desde sustratos oxidables al oxígeno; (3) cómo se usa la energía del transporte de electrones para mantener el gradiente electroquímico de protones; y (4) cómo la energía de este gradiente dirige la síntesis de ATP. Comenzaremos el estudio del metabolismo energético aeróbico, centrándonos en la mitocondria, debido al papel determinante que desempeña este orgánulo en el metabolismo energético eucariota.

La mitocondria: donde tiene lugar todo el proceso

Nuestro análisis de la respiración aerobia comenzará con una descripción de la **mitocondria**, ya que la mayor parte del metabolismo energético aeróbico ocurre dentro de este orgánulo. Debido a esto, la mitocondria es frecuentemente llamada la «central energética» de la célula eucariota. Ya en 1850, el biólogo alemán Rudolph Kölliker, describió la presencia de lo que él llamó «una serie ordenada de partículas» en las células musculares. Se observó que estas partículas aisladas se hinchaban en el agua, lo que llevó a Kölliker a la conclusión de que estas partículas estaban rodeadas de una membrana semipermeable. Actualmente se conoce a estas partículas como *mitocondrias* y se cree que provienen de bacterias que fueron englobadas por células más grandes, pero que sobrevivieron y quedaron como residentes permanentes en el citoplasma de la célula hospedadora (*véase* la Teoría Endosimbiótica, Anexo 11A).

Hace casi 100 años que empezaron a acumularse pruebas que sugerían la participación de este orgánulo en procesos oxidativos. En 1913, por ejemplo, Otto Warburg mostró que estos orgánulos podían consumir oxígeno. Sin embargo, la mayor parte de nuestro conocimiento acerca de la función de la mitocondria en el metabolismo energético proviene del desarrollo de la centrifugación diferencial, desarrollado por Albert Claude (*véase* Figura 12A.2). En 1948 se consiguió aislar mediante esta técnica, mitocondrias intactas y funcionalmente activas. Posteriormente, Eugene Kennedy, Albert Lehninger y otros, mostraron que estos orgánulos eran capaces de llevar a cabo todas las reacciones del ciclo del TCA, el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa.

Las mitocondrias se encuentran con frecuencia en los lugares en los que la necesidad de ATP es mayor

Las mitocondrias están presentes en prácticamente todas las células aeróbicas de los organismos eucariotas y son elementos destacados de la mayoría de los tipos celulares cuando se examinan al microscopio electrónico (Figura 10.2). Las mitocondrias se encuentran, tanto en las células quimiótrofas como en las fotótrofas y por lo tanto son elementos comunes no sólo en los animales, sino también en las plantas. Su presencia en células fotótrofas nos recuerda que también los organismos fotosintéticos pueden llevar a cabo la respiración, de la que dependen para satisfacer sus necesidades energéticas y de carbono durante los periodos de oscuridad, y en todo momento en los tejidos no fotosintéticos, como las raíces de las plantas.

La importancia de la mitocondria para cubrir las necesidades celulares de ATP, se refleja frecuentemente en la localización de las mitocondrias dentro de la célula. Muchas veces, las mitocondrias se encuentran agrupadas en las regiones celulares con mayor actividad metabólica, donde los requerimientos de ATP son mayores. Las células musculares son un buen ejemplo de esto (*véase* Figura 4.13). En estas células, las mitocondrias se encuentran organizadas en columnas a lo largo de las fibrillas responsables de la contracción. Otros ejemplos de estas localizaciones estratégicas de las mitocondrias se observan en los cilios y flagelos o en la cola de los espermatozoides (*véase* Figura 4.12).

¿Son las mitocondrias redes interconectadas en vez de orgánulos independientes?

Cuando se observan mitocondrias en micrografías electrónicas como las de las Figuras 10.2 y 4.13, suelen aparecer como estructuras ovaladas, con forma de salchicha, con

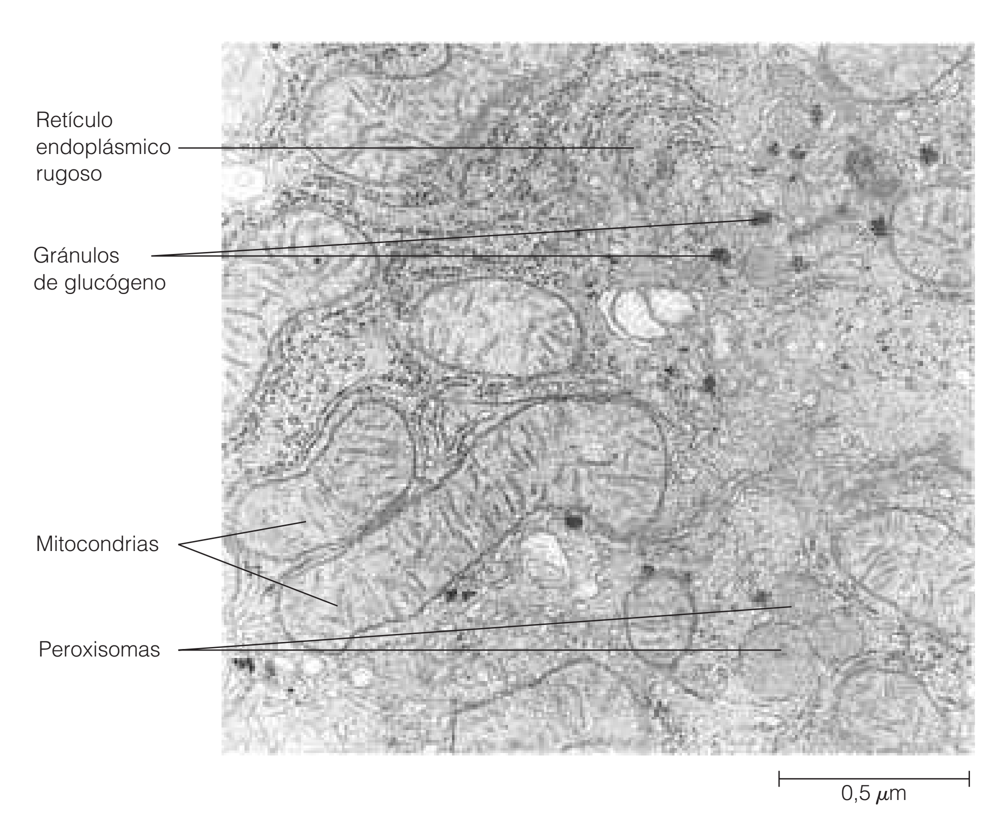


Figura 10.2 La importancia de las mitocondrias. Las mitocondrias son elementos destacados en esta fotografía de microscopio electrónico de una célula hepática de rata. Se muestran también otros componentes celulares, como el retículo endoplásmico rugoso, los gránulos de glucógeno y los peroxisomas (TEM).

una longitud de varios micrómetros y con un diámetro de 0,5-1,0 μm, si bien pueden tener formas y tamaños diferentes dependiendo del tipo celular. Esta apariencia ha fomentado la ampliamente aceptada visión de que las mitocondrias son entidades separadas y que son orgánulos grandes y muy numerosos. De hecho, una mitocondria de esas dimensiones tiene un tamaño similar a una bacteria y representa el orgánulo más grande después del núcleo en la mayoría de las células animales (*véase* Figura 1A.1). (En las células vegetales, los cloroplastos y algunas vacuolas son normalmente más grandes incluso que las mitocondrias).

Se han hecho cálculos basados en micrografías electrónicas de cortes transversales, que indican que el número de mitocondrias por célula es muy variable, en un rango que va desde una o muy pocas por célula en muchos protistas, hongos y algas (y en muchas células de mamíferos también) hasta miles por célula en algunos tejidos de vegetales superiores y de animales. Por ejemplo, se estima que cada hepatocito de mamífero contiene alrededor de 500-1.000 mitocondrias, a pesar de que sólo unas pocas de ellas se ven en una sección fina típica preparada para microscopía electrónica, como se muestra en la Figura 10.2.

El concepto de que las formas mitocondriales que se observan en las micrografías electrónicas representan orgánulos independientes de tamaño y abundancia conocido cambió a partir del trabajo de Hans-Peter Hoffman y Charlotte Avers. Después de examinar series completas de cortes finos a lo largo de toda la célula de una levadura, dichos investigadores concluyeron que las formas ovaladas que se observaban en micrografías individuales representaban porciones de una única mitocondria grande y muy ramificada (Figura 10.3). Estos resultados sugieren que el número de mitocondrias presentes en una célula puede ser considerablemente menor que lo que se suele pensar, y que el tamaño de una mitocondria puede ser mucho mayor del que se puede calcular a partir de las formas individuales observadas en cortes transversales de micrografías electrónicas de cortes delgados.

Los estudios de células vivas intactas, examinadas con el microscopio de contraste de fases o mediante microscopía de fluorescencia, utilizando colorantes fluorescentes específicos de las mitocondrias, suponen un apoyo añadido al concepto de que la mitocondrias forman una red interconectada más que un conjunto de numerosos orgánulos separados. Estas investigaciones ponen de manifiesto que las células vivas contienen mitocondrias grandes y ramificadas en un estado de flujo dinámico, con segmentos separándose por gemación y fusionándose con otra mitocondria.

Gran parte del análisis y las ilustraciones de este capítulo se basarán en la visión convencional de las mitocondrias como unidades independientes, pero recuerde que lo que entendemos como mitocondrias individuales, bien podrían ser, al menos en algunos tipos celulares, partes de una gran red dinámica.

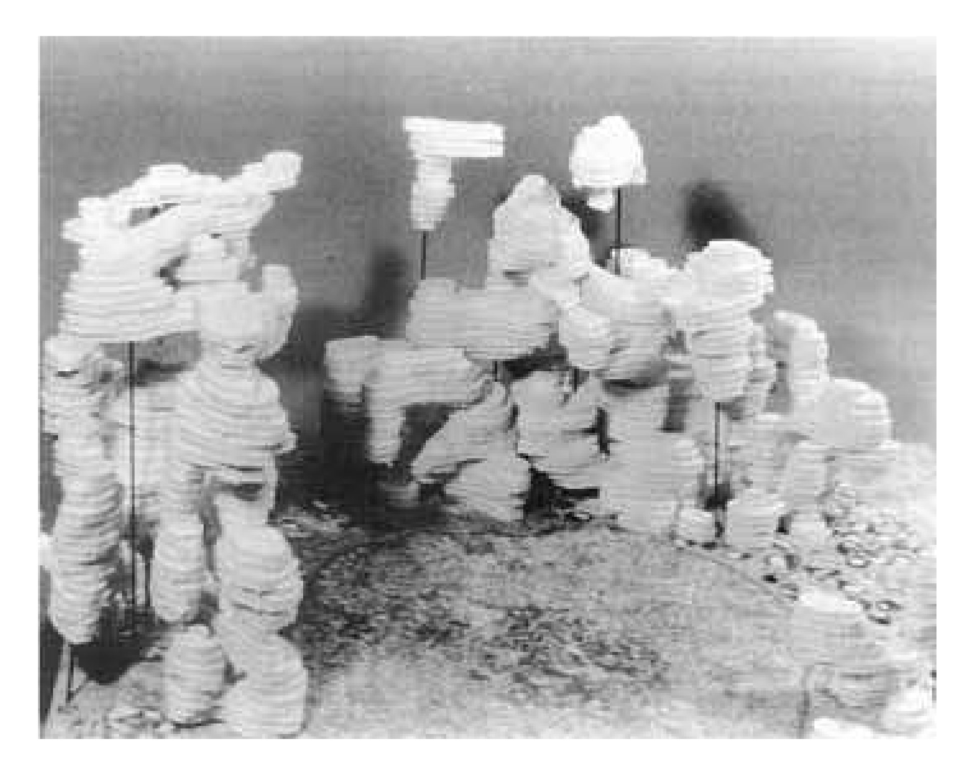


Figura 10.3 **El modelo de las redes mitocondriales interconectadas.** Este modelo se propuso tras examinar series completas de cortes finos a lo largo de una célula epidérmica. Se muestra que los perfiles mitocondriales individuales, observados en micrografías de secciones finas, pueden representar partes de una red más grande de mitocondrias interconectadas. Algunos estudios de microscopía de contraste de fases en células vivas apoyan este modelo.

Las membranas externa e interna definen dos compartimientos separados

En la Figura 10.4 se representa una mitocondria típica —o puede que un pequeño fragmento de una red mucho más grande—. De cualquier manera, la presencia de dos membranas, llamadas membrana externa e interna, es una característica distintiva. La **membrana externa** no representa una barrera de permeabilidad significativa para el paso de iones y moléculas pequeñas, ya que dispone de unos canales proteicos transmembranosos denominados **porinas,** que permiten el paso de solutos de un peso molecular de hasta 5.000. Estas proteínas son similares a las que encontramos en las membranas externas de los cloroplastos de las plantas o en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Debido a que las porinas permiten el libre trasiego de pequeñas moléculas e iones a través de la membrana externa, el **espacio intermembrana** entre la membrana externa y la interna de la mitocondria o del cloroplasto, es esencialmente continuo con el citosol, con relación a los solutos importantes para la función de estos orgánulos. Sin embargo, las enzimas localizadas en el espacio intermembrana se encuentran precisamente confinadas allí porque las enzimas, al igual que otras proteínas solubles, son demasiado grandes para pasar a través de las porinas.

A diferencia de la membrana externa, la membrana interna de la mitocondria sí representa una barrera para la permeabilidad de la mayoría de los solutos, separando, por tanto, los espacios intermembrana y del interior del orgánulo, en dos compartimientos separados.

La membrana interna de la mayoría de las mitocondrias presenta unas invaginaciones características llamadas **crestas,** que aumentan enormemente su superficie. Por ejemplo, en una mitocondria hepática normal, el área de la membrana interna es aproximadamente cinco veces mayor que la de la membrana externa. Gracias a esta gran superficie, la membrana interna puede alojar un gran número de complejos proteicos necesarios para el transporte de electrones y la síntesis de ATP, aumentando de esta manera la capacidad de la mitocondria para producir ATP. La Figura 10.5 muestra los detalles estructurales de las membranas mitocondriales interna y externa mediante la técnica de criofractura descrita en el Apéndice. Póngase especial atención en la gran densidad de proteínas asociadas con las dos caras de fractura de la membrana interna. Las proteínas representan hasta el 75% del peso de la membrana interna, una proporción mayor que en cualquier otra membrana celular. Entre estas proteínas se encuentran las partes transmembranosas de las proteínas implicadas en el transporte de solutos, en el transporte de electrones y en la síntesis de ATP.

La relativa importancia de las crestas en la mitocondria refleja normalmente la actividad metabólica relativa de la célula o el tejido en el que se encuentra el orgánulo. Las células del corazón, el riñón o los músculos presentan actividades respiratorias elevadas, y en correspondencia un elevado número de crestas. Los músculos del vuelo de las aves tienen una actividad respiratoria especialmente elevada y sus mitocondrias están particularmente dotadas de crestas.

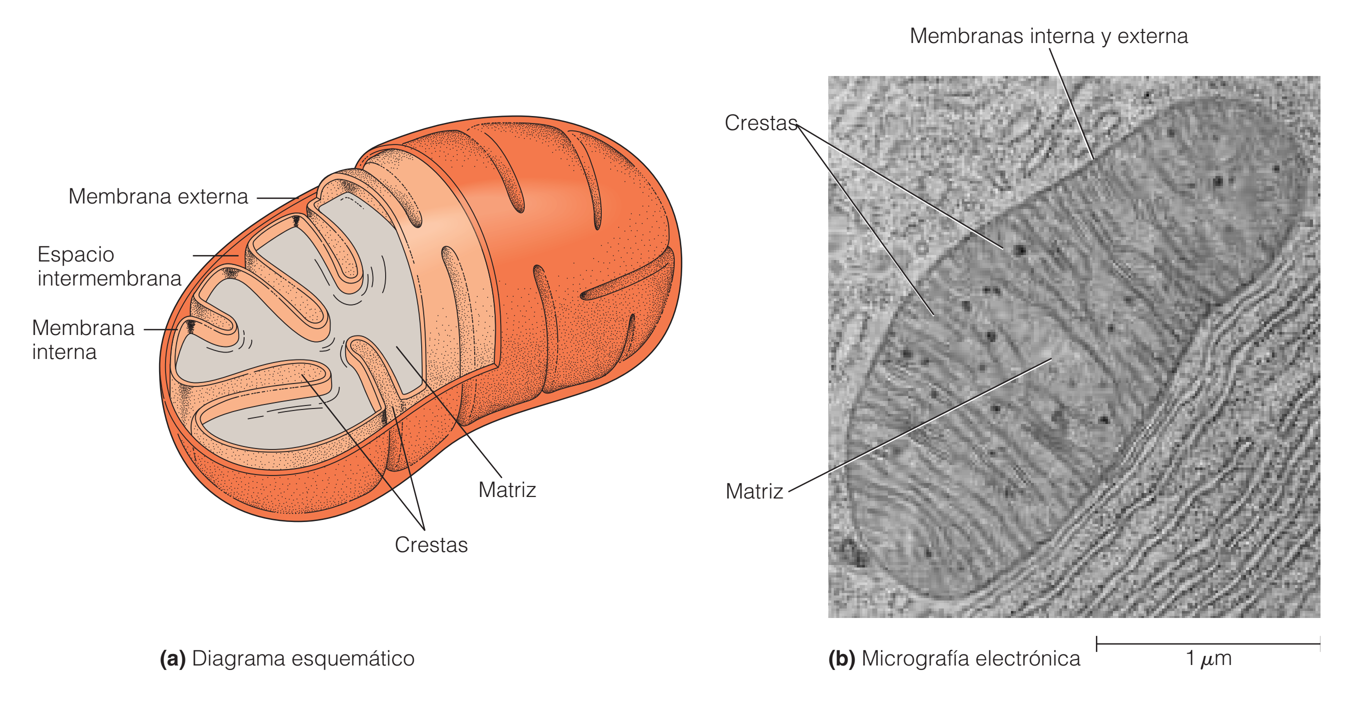


Figura 10.4 Estructura mitocondrial. (**a**) La estructura mitocondrial se representa esquemáticamente en esta visión tridimensional seccionada. (**b**) Imagen de una mitocondria del páncreas de un murciélago vista con microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las crestas son invaginaciones de la membrana interna.

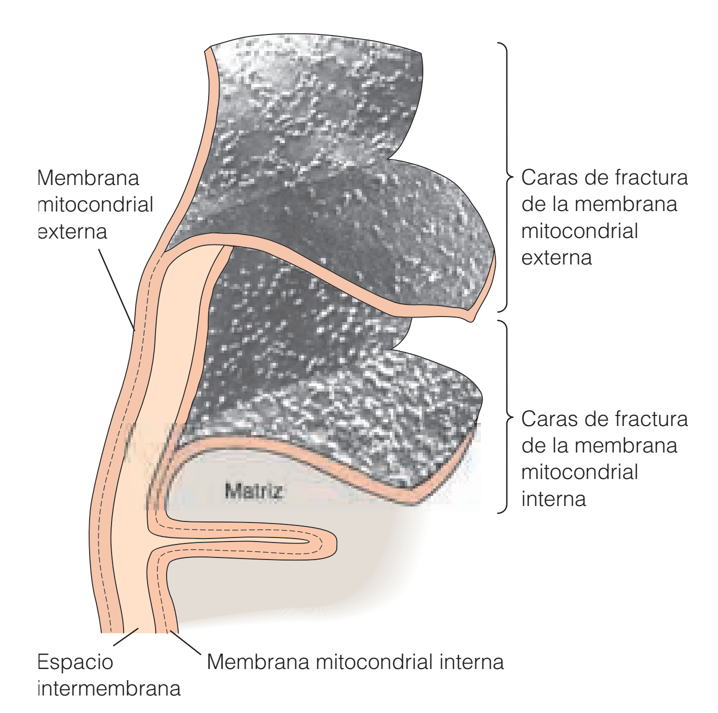


Figura 10.5 Estructura de las membranas mitocondriales interna y externa. Cuando se somete a las membranas mitocondriales interna y externa a criofractura, cada una de las membranas se escinde por su interior hidrofóbico en dos caras de fractura. En esta figura se han superpuesto partes de micrografías electrónicas de las dos caras de fractura tanto para la membrana interna como la externa, a un diagrama esquemático de las membranas fracturadas, para mostrar la densidad de partículas proteicas en cada membrana.

En contraste, las células vegetales, tienen tasas de respiración menores que la mayoría de las células animales y tienen, por lo tanto, menos crestas en sus mitocondrias.

El interior de la mitocondria está relleno de una **matriz** semifluida. En la matriz se encuentran muchas de las enzimas involucradas en la función mitocondrial, al igual que moléculas de DNA y ribosomas. En la mayor parte de los mamíferos, el genoma mitocondrial consiste en una molécula circular de DNA de entre 15.000 y 20.000 pares de bases que codifican RNAs ribosomales, RNAs de transferencia y alrededor de una docena de subunidades polipeptídicas de proteínas de la membrana interna. Además de las proteínas que están codificadas en el genoma mitocondrial, la mitocondria contiene numerosas proteínas codificadas en el núcleo, que se sintetizan en los ribosomas citoplasmáticos y que son importadas posteriormente por la mitocondria (*véase* Capítulo 22).

Las funciones mitocondriales tienen lugar en membranas específicas o dentro de los compartimientos

Las funciones y las rutas específicas se han localizado en la mitocondria mediante la ruptura del orgánulo y la separación de sus distintos componentes. La Tabla 10.1 recoge algunas de las funciones principales que tienen lugar en cada uno de los compartimientos de la mitocondria.

Tabla 10.1 Localización de las funciones metabólicas dentro de la mitocondria

Membrana o compartimiento	Funciones metabólicas
Membrana externa	Síntesis de fosfolípidos Insaturación de ácidos grasos Elongación de ácidos grasos
Membrana interna	Transporte de electrones Fosforilación oxidativa Transporte metabólico
Matriz	Oxidación del piruvato Ciclo del TCA β-oxidación de lópidos Replicación del DNA Síntesis de RNA (transcripción) Síntesis de proteínas (traducción)

La mayor parte de las enzimas mitocondriales que participan en la oxidación del piruvato, en el ciclo del TCA, y en el catabolismo de ácidos grasos y de aminoácidos, son enzimas de la matriz. De hecho, cuando se rompe la mitocondria en condiciones muy suaves, se liberan 6 de las 8 enzimas del ciclo del TCA como un único complejo multiproteico, lo que sugiere que el producto de una enzima pasa directamente a la enzima siguiente sin tener que difundir por la matriz.

Por otro lado, la mayoría de los intermediarios en la cadena de transporte de electrones son componentes integrales de la membrana interna, donde se encuentran organizados formando grandes complejos. Sobresaliendo desde la membrana interna hacia la matriz se encuentran unas esferas con forma de puño que se llaman **complejos F_1** (Figura 10.6). Cada complejo consiste en seis polipéptidos ensamblados. En la Figura 10.6a se puede observan uno de los complejos F_1, una micrografía electrónica tomada a gran aumento usando una técnica denominada *tinción negativa*, que tiene como resultado una imagen clara sobre un fondo oscuro. Los complejos F_1 tienen un diámetro aproximado de 9 nm y son especialmente abundantes en las crestas (Figura 10.6b).

Cada complejo F_1 está unido mediante un pequeño tallo proteico a un **complejo F_o***, conjunto ensamblado de proteínas hidrofóbicas que se encuentra insertado en la membrana interna (Figura 10.6c). La asociación de un complejo F_1 y otro F_o, se conoce como **complejo F_oF_1** y se considera como una *ATP sintasa,* porque ésa es su función habitual en el metabolismo energético. El complejo F_o F_1 es de hecho el responsable de la mayor parte de la producción de ATP que tiene lugar en la mitocondria —así como también en las células procariotas y en los cloroplastos—. En

* Obsérvese que el subíndice de F_o es la letra «o» y no el número 0. Esto es debido a que, en su día, se demostró que el complejo F_o confería resistencia al antibiótico oligomicina.

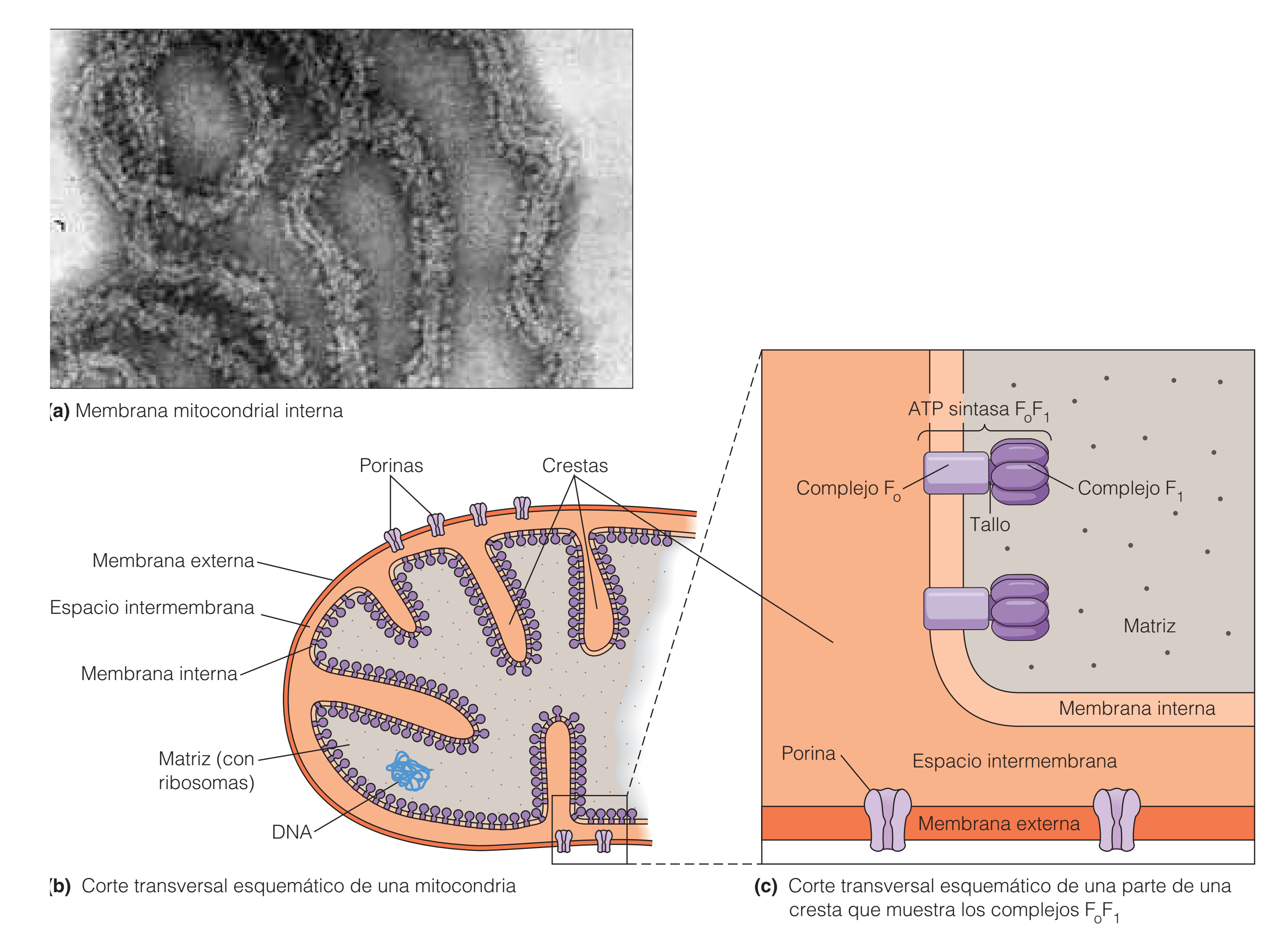


Figura 10.6 Los complejos F_1 y F_o de la membrana mitocondrial interna. (**a**) Esta micrografía electrónica se preparó mediante tinción negativa para mostrar los complejos F_1 esféricos alineados en la cara de la membrana interna que da a la matriz de una mitocondria del corazón de una oveja (TEM). (**b**) Corte transversal de una mitocondria, mostrando sus principales características estructurales. (**c**) Detalle de un pequeño fragmento de una cresta, que muestra cómo los complejos F_1 se proyectan desde la cara que da a la matriz de la membrana interna, y a los complejos F_o insertados en la membrana interna. Cada complejo F_1 está unido a un complejo F_o mediante un tallo proteico. La pareja $\mathbf{F_oF_1}$ constituye una ATP sintasa funcional.

todos los casos, la producción de ATP por los complejos F_o F_1 está dirigida por un gradiente electroquímico de protones a ambos lados de la membrana en la que dichos complejos F_o F_1 están anclados, asunto que trataremos más adelante en este capítulo.

En los procariotas, las funciones respiratorias se localizan en la membrana plasmática y en el citoplasma

Los procariotas no tienen mitocondrias y, sin embargo, la mayoría de las células procariotas son capaces de realizar la respiración aerobia. ¿Dónde se encuentran los distintos componentes del metabolismo respiratorio en la célula procariota? Básicamente, el citoplasma y la membrana plasmática de una célula procariota realizan las mismas funciones, respectivamente, que la matriz mitocondrial y la membrana interna. En las células procariotas, por tanto, la mayoría de las enzimas de la glucolisis, del ciclo del TCA y del catabolismo de ácidos grasos y aminoácidos, se encuentran en el citoplasma, mientras que las proteínas del transporte de electrones, se localizan en la membrana plasmática. El complejo F_oF_1 está también en la membrana plasmática de los procariotas, con el componente F_o incrustado en la membrana y el componente F_1 sobresaliendo desde la membrana hacia el citoplasma.

El ciclo del ácido tricarboxílico: a vueltas con la oxidación

Habiendo considerado la localización de las funciones respiratorias en la mitocondria y en las células procariotas,

volveremos ahora al contexto eucariota y seguiremos una molécula de piruvato a través de la membrana interna de una mitocondria para ver qué destino le espera allí dentro.

En presencia de oxígeno, el piruvato se oxida completamente a dióxido de carbono y la energía liberada en el proceso se usa para promover la síntesis de ATP. La primera etapa en este proceso es una ruta cíclica, que es la piedra angular del metabolismo energético de casi todas los quimitrofos aeróbicos. Un intermediario importante en estas series de reacciones cíclicas es el citrato, que tiene tres grupos carboxilo y, por lo tanto, es un ácido tricarboxílico. Por esta razón, esta ruta se denomina **ciclo del ácido tricarboxílico (TCA).** Este ciclo también se conoce habitualmente como *ciclo de Krebs* en honor a Hans Krebs, cuyo laboratorio desempeñó un papel central en el descubrimiento de esta ruta metabólica en la década de 1930.

El ciclo del TCA metaboliza acetil coenzima A (acetil CoA), que consiste en un acetato unido a un transportador llamado *coenzima A*. (La coenzima A fue descubierta por Fritz Lipmann, que compartió el Premio Nobel con Krebs en 1953 por su trabajo sobre la respiración aerobia.) El acetil CoA proviene de la descarboxilación oxidativa del piruvato o de la ruptura oxidativa de los ácidos grasos (*véase* Figura 10.1b). Independientemente de su origen, el acetil CoA transfiere su grupo acetato a un aceptor de cuatro carbonos llamado oxalacetato, formándose de esta manera citrato. El citrato es posteriomente sometido a dos descarboxilaciones oxidativas y a varias oxidaciones, dejando al final un compuesto de cuatro carbonos a partir del cual se regenera el oxalacetato inicial.

Cada vuelta del ciclo de Krebs implica la entrada de dos carbonos (el acetato del acetil CoA), la liberación de dos carbonos en forma de dióxido de carbono, y la regeneración de oxalacetato. La oxidación tiene lugar en cinco etapas: cuatro dentro del mismo ciclo y una en la reacción que convierte el piruvato en acetil CoA. En todos los casos, los electrones son captados por coenzimas. Los sustratos del ciclo de Krebs son por tanto, el acetil CoA, las coenzimas oxidadas, el ADP, y el P_i, y los productos son dióxido de carbono, coenzimas reducidas, y una molécula de ATP (o GTP, un nucleótido íntimamente relacionado).

Teniendo presente este esquema general, analizemos el ciclo del TCA más detalladamente, centrándonos en lo que les sucede a las moléculas de carbono que entran como acetil CoA y cómo se conserva la energía liberada en cada una de las oxidaciones en forma de coenzimas reducidas.

El piruvato se convierte en acetil coenzima A mediante la descarboxilación oxidativa

Como hemos señalado, la entrada de carbono en el ciclo del TCA es en forma de acetil CoA, pero en el Capítulo 9 hemos visto que la ruta de la glucolisis termina en piruvato, y no en acetil CoA. El paso de piruvato a acetil CoA requiere la actividad de la *piruvato deshidrogenasa (PDH)*, un complejo multiproteico enorme, con peso molecular de 4.6×10^6, que consta de tres enzimas, cinco coenzimas, y dos proteínas reguladoras. Todos estos componentes trabajan juntos para catalizar la *descarboxilación oxidativa* del piruvato:

$$\underset{\text{Coenzima A}}{\text{CoA—SH}} + \underset{\text{Piruvato}}{{}^{3}\text{CH}_3\text{—}{}^{2}\overset{\text{O}}{\overset{\|}{\text{C}}}\text{—}{}^{1}\overset{\text{O}}{\overset{\|}{\text{C}}}\text{—O}^-} \xrightarrow{\text{NAD}^+ \;\to\; \text{NADH}} \underset{\text{Acetil CoA}}{\text{CoA—S—}{}^{1}\overset{\text{O}}{\overset{\|}{\text{C}}}\text{—}{}^{2}\text{CH}_3} + \text{CO}_2 \qquad \textbf{(10.1)}$$

Esta reacción es una *descarboxilación* porque uno de los carbonos del piruvato (el átomo de carbono 1) se libera como dióxido de carbono. El resultado es que, los átomos de carbono 2 y 3 del piruvato se convierten, respectivamente, en los carbonos 1 y 2 del acetato. Además, esta reacción es una oxidación porque se transfieren dos electrones (además de un protón) desde el sustrato a la coenzima NAD^+. Los electrones transportados por el NADH representan energía potencial que se utiliza cuando el NADH es reoxidado posteriormente por el sistema de transporte de electrones.

La oxidación del piruvato tiene lugar en el átomo de carbono 2, que es oxidado de un α-ceto a un grupo carboxílico. Esta oxidación es posible gracias a la eliminación concominante del átomo de carbono 1 en forma de dióxido de carbono. La oxidación es altamente exergónica ($\Delta G°' = -7{,}5$ kcal/mol), y la energía libre se utiliza para activar la molécula de acetato mediante su unión al grupo sulfhidrilo de la **coenzima A (CoA),** formando **acetil CoA**.

Como se muestra en la Figura 10.7, la CoA es una molécula compleja que contiene a la vitamina B *ácido pantoténico*. Al igual que la nicotinamida del NAD^+, el ácido pantoténico se clasifica como una vitamina porque los hombres y otros vertebrados la necesitan como parte de una coenzima esencial que no pueden sintetizar por sí mismos. El grupo sulfhidrilo, o *tiol* en el extremo de la molécula de CoA puede formar un enlace tioéster con ácidos orgánicos como el acetato. El grupo tiol es lo suficientemente importante para que cuando abreviemos la coenzima A no lo hagamos como CoA sólo, sino como CoA—SH. Si lo comparamos con un enlace éster, el enlace tioéster es un enlace más energético porque se libera significativamente más energía tras su hidrólisis. De la misma manera que el NAD^+ está diseñado para el transporte de electrones, la coenzima A lo está para el transporte del acetato o de otros grupos acilo. (De hecho, el «A» de su nombre viene de su función transportadora de grupos *acilos.*) Por lo tanto, el grupo acetilo que se transfiere a la coenzima A mediante una de las enzimas del complejo PDH (representado en la Figura 10.7 como E—SH), está en una forma activada, o de alta energía.

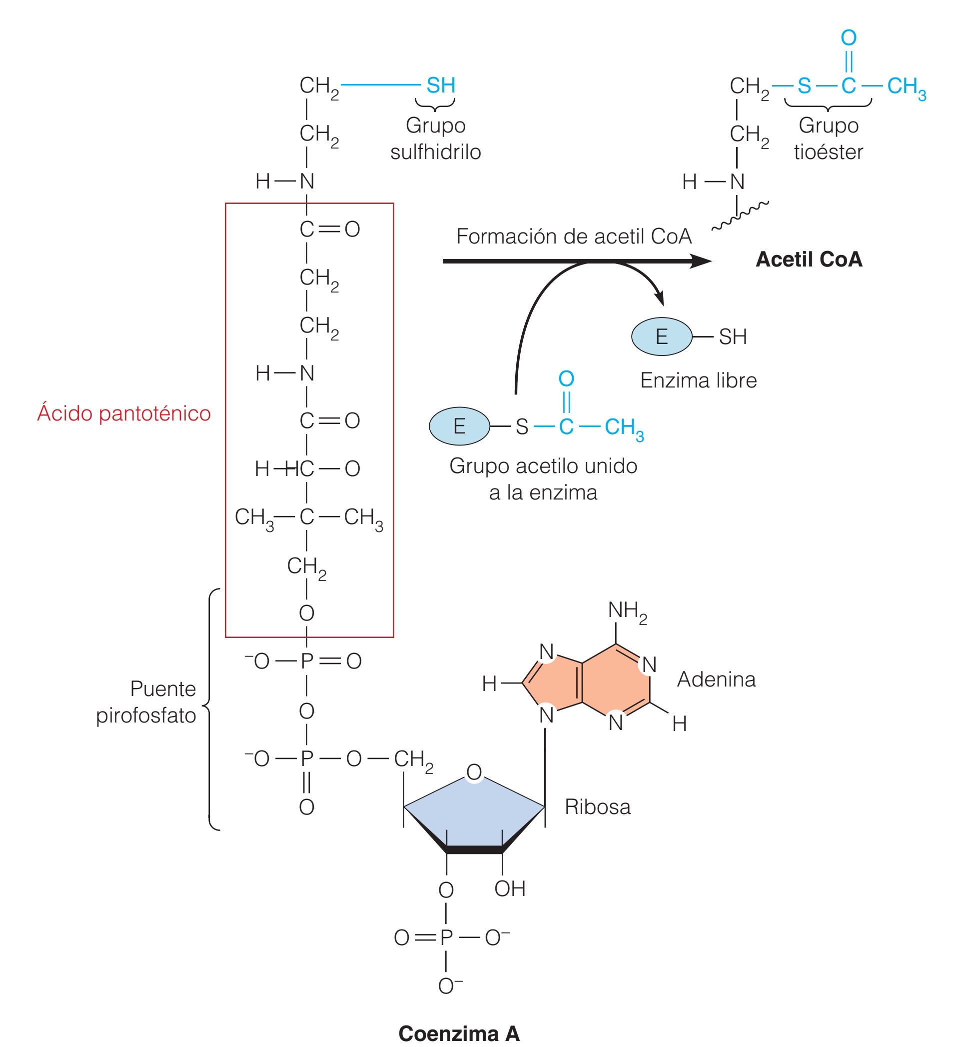


Figura 10.7 Estructura de la coenzima A y formación de acetil CoA. La parte de la coenzima recuadrada en rojo es el ácido pantoténico, perteneciente al complejo vitamínico B. La formación del enlace tioéster entre la CoA y un grupo acetilo genera la acetil coenzima A. El grupo acetilo se forma por la descarboxilación oxidativa del piruvato (reacción PDH en la Figura 10.8) y es transferido a la CoA por una de las enzimas del complejo piruvato deshidrogenasa, a la que está unido como un tioéster tras la oxidación del piruvato.

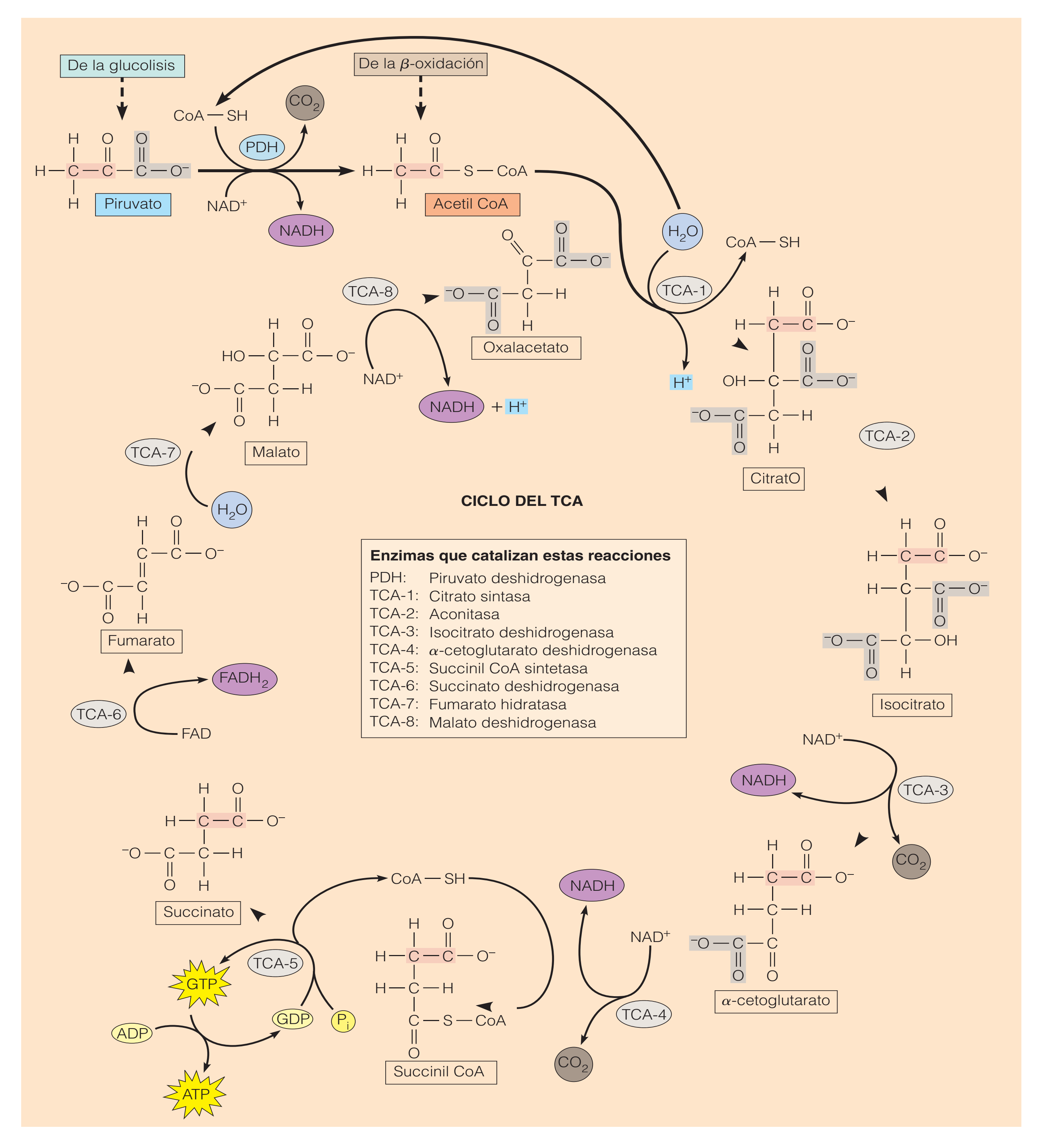
El ciclo del TCA comienza con la entrada de acetato en forma de acetil CoA

El ciclo del TCA (Figura 10.8) comienza con la entrada de acetato en forma de acetil CoA. En cada vuelta del ciclo del TCA, entran dos átomos de carbono en la forma orgánica (como acetato) y salen dos átomos de carbono en forma inorgánica (como dióxido de carbono). En la primera reacción (TCA-1), el grupo acetato de dos carbonos del acetil CoA, se une al compuesto de cuatro carbonos oxalacetato, para formar citrato, una molécula que contiene seis carbonos. Esta condensación está dirigida por la energía libre de hidrólisis del enlace tioéster y está catalizada por la enzima *citrato sintasa.* Obsérvese que el citrato es un ácido tricarboxílico —el tipo de compuesto que da al ciclo del TCA su nombre—. (Los dos átomos de carbono entrantes se muestran en color rosa en la Figura 10.8, con el fin de facilitar su búsqueda en las reacciones subsiguientes.)

En dos reacciones de oxidación del ciclo del TCA se forma NADH y se libera CO_2

A continuación veremos que cuatro de las ocho etapas del TCA son oxidaciones. Este hecho es patente en la Figura 10.8 ya que en cuatro de las reacciones (TCA-3, TCA-4, TCA-6 y TCA-8) intervienen coenzimas que entran en forma oxidada y salen en forma reducida. Cada una de estas reacciones está catalizada por una deshidrogenasa, que es específica de un sustrato en particular. Las dos primeras de estas reacciones, TCA-3 y TCA-4, son también etapas descarboxilativas: se elimina una molécula de CO_2 en cada una, y se reduce el número de carbonos de seis a cinco y después de cinco a cuatro.

Previamente, sin embargo, la reacción TCA-2 convierte al citrato en un compuesto relacionado, el isocitrato, mediante la *aconitasa.* A diferencia del citrato, el isocitrato tiene un grupo hidroxilo que puede ser fácilmente oxidable. Este grupo hidroxilo del isocitrato se convierte en la diana



Enzimas que catalizan estas reacciones

PDH:	Piruvato deshidrogenasa
TCA-1:	Citrato sintasa
TCA-2:	Aconitasa
TCA-3:	Isocitrato deshidrogenasa
TCA-4:	α-cetoglutarato deshidrogenasa
TCA-5:	Succinil CoA sintetasa
TCA-6:	Succinato deshidrogenasa
TCA-7:	Fumarato hidratasa
TCA-8:	Malato deshidrogenasa

Figura 10.8 El ciclo del ácido tricarboxílico. Los dos átomos de carbono del piruvato que entran en el ciclo vía Acetil CoA se señalan en rosa en el citrato y las siguientes moléculas, hasta que se desordenan por la simetría de la molécula del fumarato. El átomo de carbono que se pierde en forma de CO_2 se muestra en gris, ya que son los dos grupos carboxilos del oxalacetato los que generan CO_2 en las reacciones TCA-3 y TCA-4. De todas las reacciones, cinco son oxidaciones, con el NAD^+ como aceptor de electrones en cuatro de ellas (PDH, TCA-3, TCA-4 y TCA-8) y FAD en un caso (TCA-6). La forma reducida de la coenzima se muestra en violeta en cada caso. Nótese que cuando se libera CO_2, no se desprende ningún H^+ durante la reducción del NAD^+, manteniéndose de esta manera el equilibrio de carga de estas reacciones. La producción de GTP que se indica en la reacción TCA-5 es característico de las mitocondrias de los animales. En las mitocondrias de los vegetales y de las bacterias, se forma ATP directamente, pero las reacciones son equivalentes desde un punto de vista energético ya que le GTP y el ATP poseen la misma energía de hidrólisis y son fácilmente interconvertibles, como se muestra en TCA-5.

de la primera oxidación, o deshidrogenación, del ciclo (TCA-3). El isocitrato es oxidado por la enzima isocitrato deshidrogenasa a un compuesto de seis carbonos llamado *oxalosuccinato* (que no se muestra en la figura), con el NAD^+ como aceptor de electrones. El oxalosuccinato es inestable e inmediatamente sufre una descarboxilación y se convierte en α-cetoglutarato. Esta reacción es la primera de las dos reacciones de descarboxilación oxidativa del ciclo.

La segunda descarboxilación oxidativa tiene lugar en el siguiente paso, la reacción TCA-4, y también utiliza al NAD^+ como aceptor de electrones. Esta reacción es parecida a la descarboxilación oxidativa del piruvato mostrada anteriormente. Tanto el α-cetoglutarato, como el piruvato son α-cetoácidos, por lo que no debe sorprender que el mecanismo de oxidación sea el mismo en los dos, finalizando con una descarboxilación y la unión del producto de la oxidación a la coenzima A, en forma de tioéster. De esta manera, el α-cetoglutarato se oxida a succinil CoA, en una reacción catalizada por la enzima *α-cetoglutarato deshidrogenasa.*

La producción directa de GTP (o ATP) tiene lugar en una etapa del ciclo del TCA

En estos momentos, el balance de carbono del ciclo está satisfecho: han entrado dos átomos de carbono en forma de acetil CoA, y se han liberado dos átomos de carbono como CO_2. (Pero observe con atención en la Figura 10.8 que los dos átomos de carbono que son liberados en un ciclo *no son los mismos dos átomos* que entraron en la reacción TCA-1 del ciclo). Ya nos hemos encontrado con dos de las cuatro reacciones de oxidación del ciclo del TCA y, por lo tanto, se han generado dos moléculas de NADH. Además, hemos visto que el succinil CoA es un compuesto que, al igual que el acetil CoA, tiene un enlace tioéster, cuya hidrólisis es altamente exergónica.

La energía de este enlace tioéster se usa para generar una molécula de ATP (en las mitocondrias de bacterias y de células vegetales) o GTP (en las mitocondrias de las células animales). De hecho, es la formación de succinil CoA más que el succinato libre de la reacción precedente (TCA-4), el que conserva la energía de la oxidación del α-cetoglutarato en forma de un enlace tioéster, el cual, una vez hidrolizado, es capaz de generar ATP o GTP posteriormente en la reacción TCA-5. Obsérvese que el GTP y el ATP son energéticamente equivalentes ya que sus uniones fosfoanhídridas terminales tienen la misma energía libre de hidrólisis. De esta manera, el resultado neto de la hidrólisis del succinil CoA es la producción de una molécula de ATP, ya sea directamente o a través del GTP, como se recoge en la Figura 10.8.

Las reacciones oxidativas finales del ciclo del TCA generan $FADH_2$ y NADH

De las tres etapas restantes del ciclo del TCA, dos son oxidaciones. En la reacción TCA-6, el succinato formado en el paso anterior se oxida a fumarato. Esta reacción es única, en el sentido de que los electrones provienen de átomos de carbono adyacentes y se forma de esta manera un doble enlace C═C. (Hasta ahora, todas las oxidaciones que nos hemos encontrado implicaban la pérdida de electrones de un carbono y un oxígeno adyacentes, generándose un doble enlace C═O). La oxidación de un enlace carbono-carbono libera menos energía que la oxidación de un enlace carbono-oxígeno, de hecho no es suficiente para transferir los electrones exergónicamente al NAD^+. Por esto, el aceptor de electrones para esta deshidrogenación no es NAD^+ sino una coenzima de menor energía, el **dinucleótido de flavina y adenina** (FAD). Al igual que el NAD^+ y la coenzima A, el FAD posee una vitamina del complejo B como parte de su estructura, riboflavina, en este caso (Figura 10.9). El FAD acepta dos protones y dos electrones, por lo que la forma reducida se indica como $FADH_2$. Como veremos más adelante, el rendimiento máximo de ATP de la oxidación de las coenzimas es de aproxidamente tres para el NADH y sólo alrededor de dos para el $FADH_2$.

En el siguiente paso del ciclo, el doble enlace del fumarato es hidratado, formándose malato (reacción TCA-7, catalizada por la enzima *fumarato hidratasa*). Dado que el fumarato es una molécula simétrica, el grupo hidroxilo del agua tiene la misma probabilidad de unirse a cualquiera de los átomos de carbono internos. Como resultado, los átomos de carbono de la Figura 10.8 que estaban marcados en rosa para seguir la pista al grupo acetato que ha entrado en el ciclo más recientemente, se distribuyen al azar en este paso y por lo tanto no se marcarán con ningún color a partir de ahora. En la reacción TCA-8, el grupo hidroxilo del malato se convierte en la diana de la oxidación final del ciclo. De nuevo, el NAD^+ actúa como aceptor de electrones, y el producto lo constituye el correspondiente α-cetoácido, el oxalacetato.

En resumen: los productos del ciclo del TCA son CO_2, ATP, NADH y $FADH_2$

Con la regeneración del oxalacetato, se completa una vuelta del ciclo. Podemos resumir el proceso señalando las siguientes propiedades del ciclo del TCA:

1. El acetato entra en el ciclo como acetil CoA y se une a una molécula aceptora de cuatro átomos de carbono para formar citrato, un compuesto de seis carbonos.
2. La descarboxilación ocurre en dos etapas del ciclo por lo que la entrada de dos carbonos en forma de acetato se compensa por la pérdida de dos carbonos en forma de dióxido de carbono.
3. La oxidación tiene lugar en cuatro etapas, con el NAD^+ como aceptor de electrones en tres casos y el FAD en uno de ellos.
4. El ATP se genera en un solo momento, con el GTP como intermediario en las células animales.

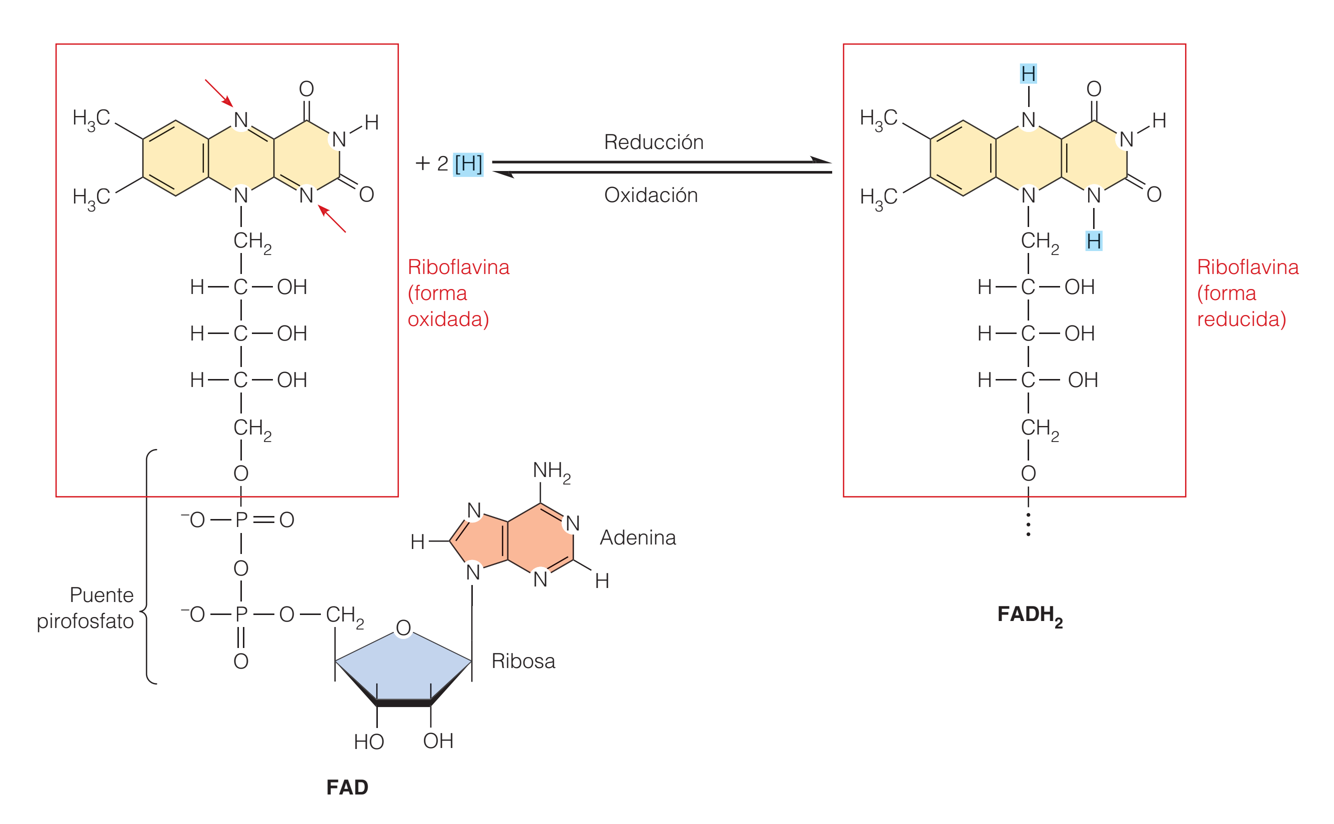


Figura 10.9 Estructura de FAD y su oxidación y reducción. La parte de la coenzima recuadrada en rojo es la riboflavina, una vitamina B. Las flechas señalan los dos átomos de nitrógeno de la riboflavina que toman cada uno un protón y un electrón cuando el FAD se reduce a $FADH_2$. La mitad de la molécula que incluye a la riboflavina y a un grupo fosfato representa la estructura del mononucleótido de flavina (FMN), una coenzima relacionada.

5. Se completa una vuelta del ciclo con la regeneración del oxoalacetato, el aceptor original de cuatro carbonos.

Reuniendo las ocho reacciones que componen el ciclo del TCA que se muestra en la Figura 10.8, obtenemos a una reacción global (en ésta y en las reacciones posteriores, los protones y las moléculas de agua no se muestran explícitamente si están sólo presentes para la compensación eléctrica o química). Esta reacción tiene la siguiente forma:

$$\text{Acetil CoA} + 3\,\text{NAD}^+ + \text{FAD} + \text{ADP} + \text{P}_i \longrightarrow 2\text{CO}_2 + 3\text{NADH} + \text{FADH}_2 + \text{CoA—SH} + \text{ATP} \quad \textbf{(10.2)}$$

Como el ciclo tiene que verificarse dos veces para metabolizar las dos moléculas de acetil CoA que derivan de una única molécula de glucosa, la producción por molécula de glucosa se puede obtener multiplicando por dos la Reacción 10.2. Si añadimos después a ésta el conjunto de reacciones de la glucolisis hasta piruvato (Reacción 9.16) y la descarboxilación oxidativa del piruvato a acetil CoA (Reacción 10.2, multiplicada también por 2), obtenemos la siguiente reacción global que resume la secuencia completa de la glucosa a lo largo del ciclo del TCA:

$$\text{glucosa} + 10\,\text{NAD}^+ + 2\text{FAD} + 4\text{ADP} + 4\text{P}_i \longrightarrow 6\text{CO}_2 + 10\text{NADH} + 2\text{FADH}_2 + 4\text{ATP} \quad \textbf{(10.3)}$$

Hay dos aspectos chocantes en esta reacción de resumen: que el rendimiento de ATP después de todo, es bastante modesto y que son muchas las moléculas de coenzimas que se reducen durante la oxidación de la glucosa. No obstante, debemos tener también en cuenta que las coenzimas NADH y $FADH_2$ son compuestos de alta energía. Como veremos más adelante en este capítulo, la transferencia de electrones desde estas coenzimas hasta el oxígeno es altamente exergónica. De esta manera, la reoxidación de 12 coenzimas reducidas que se muestran en la parte derecha de la Reacción 10.3, proporciona la energía necesaria para dirigir la síntesis de la mayor parte de las moléculas de ATP que se producen durante la oxidación completa de la glucosa.

Para la liberación de esa energía, debemos tratar las etapas restantes del metabolismo respiratorio —transporte de electrones y la fosforilación oxidativa—. No obstante, antes de hacerlo, trataremos algunos aspectos adicionales del ciclo del TCA; su regulación, su papel central en el metabolismo energético y su función en otras rutas metabólicas.

Varias enzimas del ciclo del TCA están sujetas a una regulación alostérica

Como todas las rutas metabólicas, el ciclo del TCA debe estar cuidadosamente regulado para asegurar que su activi-

dad esté acoplada a las necesidades de la célula. Los principales lugares de regulación se muestran en la Figura 10.10. La mayor parte del control consiste en la **regulación alostérica** de cuatro enzimas clave, por medio de *moléculas efectoras* específicas que se unen a ellas de forma reversible. Como podemos recordar del Capítulo 6, las moléculas efectoras pueden ser tanto inhibidoras como activadoras, y son indicadas, respectivamente, como un signo menos de

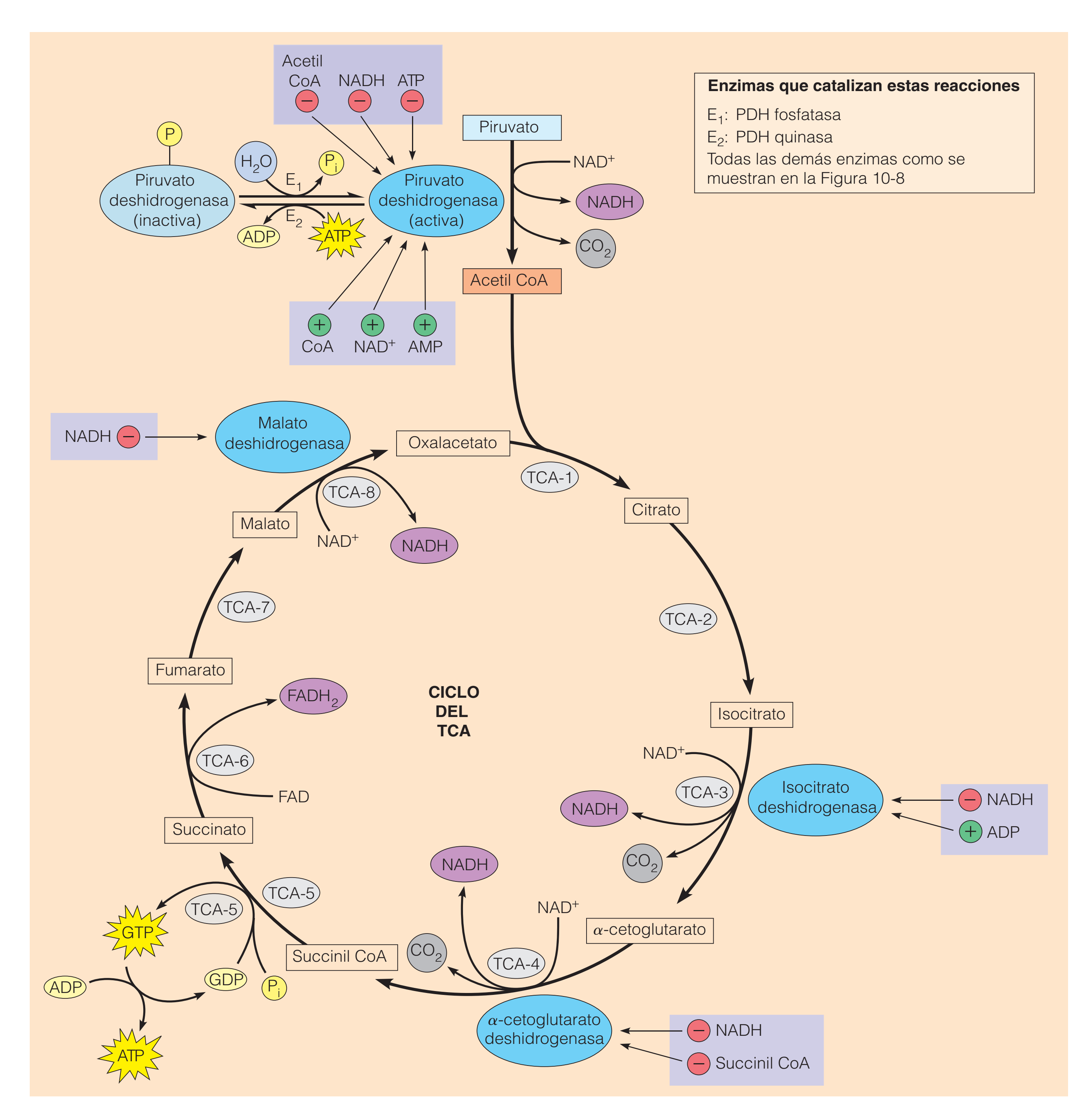


Figura 10.10 Regulación del ciclo del TCA. El ciclo del TCA y la reacción deshidrogenasa precedente del piruvato se muestran aquí en formato resaltado, con las enzimas reguladoras en azul. Los efectos reguladores principales se indican como activación (+) o inhibición (−). Los reguladores alostéricos incluyen CoA, NAD^+, AMP y ADP como activadores y acetil CoA, NADH, ATP y succinil CoA como inhibidores. Aparte de su efecto alostérico sobre la actividad de la piruvato deshidrogenasa, el ATP activa la PDH quinasa (E_2), la enzima que fosforila uno de los componentes del complejo PDH, haciendo que se inactive. La enzima PDH fosfatasa (E_1), elimina el grupo fosfato, volviendo a activar al complejo PDH.

color rojo y un signo más de color verde, en la Figura 10.10. Aparte de la regulación alostérica, el complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) se activa e inactiva mediante una fosforilación y desfosforilación reversible de uno de sus componentes proteicos.

Para apreciar el significado de la regulación del ciclo del TCA, recuerde que usa acetil CoA, NAD^+, FAD y ADP como sustratos y que genera como productos NADH, $FADH_2$, CO_2 y ATP (*véase* la Reacción 10.3). Tres de estos productos —NADH, ATP, y acetil CoA— son importantes efectores de una o más enzimas, como se muestra en la Figura 10.10. Además, NAD^+, ADP y AMP activan cada uno al menos a una de las enzimas reguladoras. Desde este punto de vista, el ciclo es altamente sensible a los estados redox y energético de la célula, valorados como la relación NADH/NAD^+ y las concentraciones relativas de ATP, ADP y AMP.

Las cuatro deshidrogenasas generadoras de NADH que se muestran en la Figura 10.10 son inhibidas por NADH. El aumento de la concentración de NADH en la mitocondria disminuye, por tanto, la actividad de estas deshidrogenasas, lo que conduce a una reducción en la actividad del ciclo del TCA. Además, el complejo PDH es inhibido por el ATP (que es más abundante cuando hay mucha energía), y tanto la PDH como la isocitrato deshidrogenasa son activadas por el ADP y AMP (más abundantes cuando se requiere energía).

La disponibilidad general de acetil CoA está determinada principalmente por la actividad del complejo PDH (*véase* Reacción 10.1), que es inhibido alostéricamente por NADH, ATP y acetil CoA y es activado por NAD^+, AMP y CoA libre (Figura 10.10). Asimismo, este complejo enzimático es inactivado por la fosforilación de uno de sus componentes proteicos cuando la relación [ATP]/[ADP] es baja. Estas reacciones de fosforilación y desfosforilación están catalizadas por la *PDH quinasa* y la *PDH fosfatasa*, respectivamente. No es sorprendente por lo tanto, que el ATP sea un inactivador de la quinasa y un inhibidor de la fosfatasa.

Como resultado de estos múltiples mecanismos de control, la producción de acetil CoA es sensible a las relaciones [acetil CoA]/[CoA] y [NADH]/[NAD] en la mitocondria y también al contenido mitocondrial de ATP. Aparte de estos efectos reguladores sobre las reacciones del ciclo del TCA, existe un control por retroalimentación del ciclo sobre la ruta glucolítica, gracias a los efectos inhibidores del citrato y de la acetil CoA sobre la fosfofructoquinasa y la piruvato quinasa, respectivamente (*véanse* Figuras 9.12 y 10.10).

El ciclo del TCA desempeña un papel central en el catabolismo de grasas y proteínas

Es imprescindible entender el papel central del ciclo del TCA en todo el metabolismo energético aeróbico. Hasta ahora, hemos considerado a la glucosa como el sustrato principal de la respiración celular. A pesar de que la mayor parte de las reacciones generales descritas para el metabolismo energético quimiótrofo consideran a la glucosa como el compuesto de partida, debemos señalar el papel de otras moléculas alternativas como carburante en el metabolismo energético celular y en el ciclo del TCA, especialmente los lípidos y las proteínas. Lejos de ser una ruta menor para el catabolismo de un único azúcar, el ciclo del TCA representa la principal opción del metabolismo energético aerobio en un gran abanico de organismos, desde los microbios hasta los vegetales superiores y los animales.

La grasa como una fuente de energía. Cuando nos encontramos por primera vez a las grasas en el Capítulo 3, analizamos su papel en el almacenamiento de energía y observamos que son compuestos altamente reducidos que liberan más energía por gramo tras su oxidación que los carbohidratos. Por esta razón, las grasas son un almacén de energía de largo plazo para muchos organismos. Las reservas de grasa son especialmente importantes en los animales hibernantes y migratorios y representan también una forma común de almacenar energía y carbono por las plantas en sus semillas. Las grasas son ideales para su función de almacén porque permiten el máximo almacenamiento de calorías con el mínimo peso y volumen.

La mayoría de la grasa se almacena en forma de **triacilgliceroles** (también llamados *triacilglicéridos*), que son triésteres neutros de *glicerol* y *ácidos grasos* de cadena larga (*véase* Figura 3.27b). El catabolismo de los triacilgliceroles comienza con su hidrólisis en glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol se desvía a la ruta glucolítica por su conversión oxidativa en dihidroxiacetona fosfato, como se indica en la Figura 9.9. Los ácidos grasos están unidos a la coenzima A para formar acil CoA grasos, que son posteriormente degradados por oxidación mediante un proceso secuencial que implica la oxidación sucesiva y la eliminación de unidades de dos carbonos, generándose acetil CoA y las coenzimas reducidas NADH y $FADH_2$.

Este proceso secuencial de catabolismo de ácidos grasos a acetil CoA se denomina **β oxidación** porque el acontecimiento oxidativo inicial en cada ciclo sucesivo tiene lugar en el átomo de carbono que se encuentra en la posición β del ácido graso (es decir, el segundo carbono desde el grupo carboxilo). De esta manera, los ácidos grasos derivados de las grasas, al igual que el piruvato derivado de los carbohidratos, se convierten por oxidación en acetil CoA, que será posteriormente catabolizado por el ciclo del TCA. Es más, las enzimas de la oxidación de los ácidos grasos están localizadas en la mitocondria en muchas (si no en todas) las células eucariotas, por lo que el acetil CoA que proviene de las grasas normalmente se produce y se cataboliza dentro del mismo compartimiento celular (*véase* Figura 10.1b).

Las proteínas como una fuente de energía y de aminoácidos. Las proteínas no se consideran normalmente como fuente de energía ya que desempeñan papeles más importantes

dentro de la célula —como enzimas, proteínas transportadoras, hormonas y receptores, por ejemplo—. Pero las proteínas, también pueden ser catabolizadas para generar ATP si es necesario, especialmente cuando los depósitos de grasas y de azúcares están vacíos o no están disponibles. En los animales, el catabolismo proteico es importante en condiciones de ayuno o de inanición, o cuando la ingesta de proteínas en la dieta supera las necesidades de aminoácidos. En los vegetales, el catabolismo de proteínas proporciona la materia prima para la síntesis de proteínas durante la germinación o durante el almacenamiento de proteínas en las semillas. Asimismo, todas las células llevan a cabo una renovación de las proteínas y de las estructuras que contienen proteínas. Los aminoácidos en los que una proteína se degrada, pueden ser reciclados en proteínas o ser degradados oxidativamente para obtener energía.

El catabolismo de las proteínas comienza con la hidrólisis del enlace peptídico que mantiene a los aminoácidos unidos en una cadena polipeptídica. El proceso se denomina **proteolisis**, y las enzimas que lo llevan a cabo, *proteasas.* Los productos de la digestión proteolítica son pequeños péptidos y aminoácidos libres. Las digestiones posteriores de los péptidos están catalizadas por las peptidasas, que hidrolizan, tanto enlaces peptídicos internos (*endopeptidasas*), como externos (*exopeptidasas*).

Los aminoácidos libres, ya sean ingeridos o provengan de la digestión de las proteínas, pueden ser catabolizados para la obtención de energía. Normalmente, estos sustratos alternativos se convierten en intermediarios de rutas metabólicas más importantes en el menor número de pasos posible. A pesar de su diversidad numérica y química, todas estas rutas desembocan finalmente en unos pocos intermediarios del ciclo del TCA, principalmente acetil CoA, α-cetoglutarato, oxoalacetato, fumarato y succinil CoA.

De los 20 aminoácidos que se pueden encontrar en las proteínas, tres dan lugar a intermediarios del ciclo del TCA de una manera directa. Estos aminoácidos son la alanina, el aspartato y el glutamato, que pueden ser convertidos en piruvato, oxoalacetato y α-cetoglutarato, respectivamente (Figura 10.11). Los demás aminoácidos requieren rutas

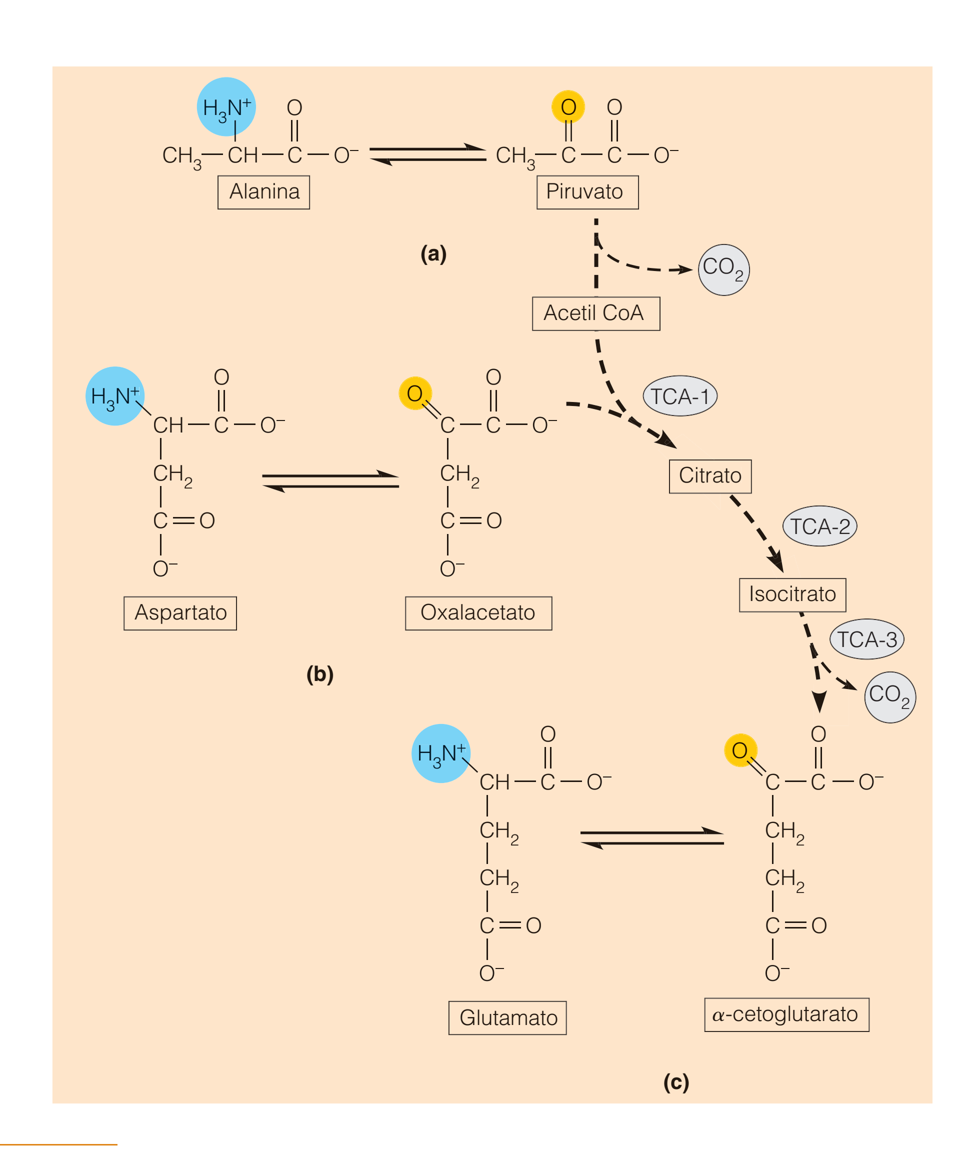


Figura 10.11 Interconversión de varios aminoácidos y sus correspondientes cetoácidos en el ciclo del TCA. Los aminoácidos (**a**) alanina, (**b**) aspartato y (**c**) glutamato pueden ser convertidos reversiblemente en sus correspondientes α-cetoácidos: piruvato, oxalacetato y α-cetoglutarato, respectivamente. Cada uno de estos cetoácidos es un intermediario del ciclo del TCA, del que se representa una parte para situar el contexto metabólico para estas reacciones. En cada caso, el grupo amino se muestra en azul y el grupo ceto en amarillo. Estas reacciones son rápidamente reversibles y desempeñan la función catabólica de convertir los aminoácidos en intermediarios del ciclo del TCA para la oxidación a CO_2 y H_2O y la función anabólica de convertir los intermediarios del ciclo del TCA en aminoácidos para usarlos en la síntesis de proteinas. Las rutas catabólicas y anabólicas para otros aminoácidos son menos directas, pero también finalizan y parten de intermediarios del metabolismo respiratorio.

más complicadas, frecuentemente con muchos intermediarios. Encontrará seguramente estas rutas en el futuro, probablemente en un curso de bioquímica. Cuando así sea, asegúrese de distinguir cuántos de ellos tienen productos finales que son intermediarios del ciclo del TCA, porque esto reforzará más aún el papel central del ciclo del TCA para todo el metabolismo energético celular.

El ciclo del TCA constituye una fuente de precursores para rutas anabólicas

La función principal del ciclo del TCA es, claramente, el catabolismo, habida cuenta de su papel en la oxidación del acetil CoA a dióxido de carbono, con la consiguiente conservación de energía libre en forma de coenzimas reducidas. En prácticamente la mayoría de las células existe un flujo considerable dentro y fuera del ciclo de intermediarios de cuatro, cinco y seis átomos de carbono. Estas reacciones colaterales reponen el suministro de intermediarios en el ciclo, según las necesidades, a la vez que se utilizan para la síntesis de compuestos derivados de alguno de los intermediarios del ciclo. Debido a que el ciclo del TCA representa un nexo entre rutas catabólicas y anabólicas, a menudo se le denomina como una **ruta anfibólica** (del griego *amphi-*, que significa «ambos»).

Además de su papel central en el catabolismo, el ciclo del TCA está involucrado en varios procesos anabólicos. Por ejemplo, las tres reacciones que se muestran en la Figura 10.11 convierten los intermediarios α-ceto del ciclo del TCA en los aminoácidos alanina, aspartato y glutamato. Estos aminoácidos son constituyentes de las proteínas, así que el ciclo del TCA está implicado indirectamente en la síntesis proteica, aportando varios de los aminoácidos que se necesitan en el proceso. El citrato y el succinil CoA son otros precursores metabólicos que provee el ciclo del TCA. El succinil CoA es el punto de partida para la síntesis del grupo hemo, mientras que el citrato puede ser transportado a la mitocondria y usado como fuente de acetil CoA para la síntesis posterior de ácidos grasos en el citosol.

El ciclo del glioxilato convierte el acetil CoA en carbohidratos

Una ruta que está relacionada con el ciclo del TCA, pero que desempeña una función anabólica es el ciclo del glioxilato que se describe en el Anexo 10A. Esta reacción tiene lugar en un tipo especial de peroxisoma llamado *glioxisoma*. El ciclo del glioxilato comparte varias reacciones con el ciclo del TCA pero le faltan las dos reacciones de descarboxilación de éste. En su lugar, se usan dos moléculas de acetato (que entran en la ruta como acetil CoA) para producir succinato, un compuesto de cuatro carbonos (*véase* Figura 10A.2). El succinato se convierte después en fosfoenolpiruvato del que pueden sintetizarse azúcares por gluconeogénesis.

Los organismos que poseen esta ruta pueden sintetizar azúcares a partir de compuestos de dos carbonos, como el acetato. El ciclo del glioxilato posibilita también la conversión de las grasas almacenadas en carbohidratos.

Transporte de electrones: flujo de electrones desde las coenzimas al oxígeno

Habiendo ya considerado las dos primeras etapas de la respiración aerobia —la glucolisis y el ciclo del TCA— hagamos una breve pausa para preguntarnos qué hemos conseguido hasta ahora. Como se señala en la Reacción 10.3, el metabolismo quimiótrofo de la energía a través del ciclo del TCA, tiene como resultado la síntesis de cuatro moléculas de ATP por cada glucosa, dos de la glucolisis y otras dos del ciclo del TCA. La oxidación completa de la glucosa a CO_2 puede producir 686 kcal/mol, pero únicamente hemos obtenido menos del 10% de esa cantidad (sólo 4 ATP con aproximadamente 10 kcal/mol cada uno, basándonos en el valor de $\Delta G'$ para la síntesis de ATP en una célula normal) ¿Dónde, se podría uno podría preguntar, está el resto de la energía? ¿Y cuándo obtendremos el rendimiento significativamente mayor de ATP característico de la respiración?

La respuesta es muy sencilla. La energía está justo ahí en la Reacción 10.3, representada por las moléculas de coenzimas reducidas NADH y $FADH_2$. Como veremos a continuación, se libera una gran cantidad de energía cuando estas coenzimas reducidas son reoxidadas por la transferencia de sus electrones al oxígeno molecular. De hecho, cerca del 90% de la energía potencial libre que está presente en una molécula de glucosa se conserva en las 10 moleculas de NADH y en las 2 moléculas de $FADH_2$, que se forman cuando se oxida una molécula de glucosa a CO_2 (*véase* Reacción 10.3). Dichas coenzimas son, por tanto, compuestos de alta energía que pueden ser usados para impulsar la síntesis de ATP después de ser convertidos en la energía potencial del gradiente electroquímico transmembrana de protones.

El proceso de reoxidación de las coenzimas mediante la transferencia de electrones al oxígeno se conoce como **transporte de electrones**. El transporte de electrones es la tercera etapa del metabolismo respiratorio (*véase* Figura 10.1b). El proceso de síntesis de ATP que lo acompaña (etapa 4), se analizará posteriormente en este capítulo. Tenga en cuenta, no obstante, que el transporte de electrones y la síntesis de ATP no son procesos independientes. Los dos son parte integrante de la respiración celular y están vinculados, funcionalmente, el uno al otro por el gradiente electroquímico de protones, que es al mismo tiempo el resultado del transporte de electrones y el origen de la energía que impulsa la síntesis de ATP.

El ciclo del glioxilato, los glioxisomas y la germinación de semillas

Las especies vegetales que almacenan reservas sustanciales de carbono y energía en sus semillas en forma de grasa, se enfrentan a un particular reto metabólico cuando sus semillas germinan: deben convertir la grasa almacenada en sacarosa, que es la fuente inmediata de carbono y energía para la mayoría de las células durante la germinación. Muchas plantas pertenecen a esta categoría, incluyendo especies oleaginosas tan conocidas como la soja, el cacahuete, el girasol, el ricino y el maíz. La grasa está formada principalmente en triacilgliceroles (triglicéridos) y se almacena como *cuerpos lipídicos*, ya sea en los cotiledones del embrión de la planta o en el endospermo, el tejido nutritivo que rodea y nutre al embrión durante su desarrollo. La micrografía electrónica de la Figura 10A.1 muestra la prominencia de los cuerpos lipídicos en el cotiledón de una semilla de pepino.

La ventaja de almacenar grasa en vez de carbohidratos, se hace patente si consideramos que un gramo de triacilglicerol contiene más del doble de energía que un gramo de carbohidratos. Esta diferencia permite a las especies que almacenan grasas, empaquetar la mayor cantidad de carbono y calorías en el mínimo espacio posible. Sin embargo, esto implica que dichas especies tienen que ser capaces de convertir la grasa almacenada en azúcar cuando las semillas germinen.

La transformación de grasas en azúcar no es posible para la mayoría de los organismos. Muchos organismos convierten rápidamente azúcar y otros carbohidratos en grasas que se almacenan. Pero la mayoría de los organismos eucariotas no pueden llevar a cabo el proceso inverso. Para las semillas de las especies vegetales que almacenan grasa, sin embargo, la conversión de los triacilgliceroles almacenados en sacarosa es esencial, porque la sacarosa es la forma en la que se transporta carbono y energía al brote en crecimiento y a los ápices de las raíces de la semilla en desarrollo.

Las rutas metabólicas que hacen esto posible son la β-oxidación y el **ciclo del glioxilato.** La función de la β-oxidación es degradar la grasa almacenada a acetil CoA. El acetil CoA entra después en el ciclo del glioxilato (Figura 10A.2), una ruta cíclica de cinco pasos, que recibe su nombre de uno de sus intermediarios, el cetoácido de dos carbonos denominado glioxilato. El ciclo del glioxilato está relacionado con el ciclo del TCA, con quien tiene tres reacciones en común. Sin embargo, hay una diferencia crucial: la presencia de dos enzimas específicas de los glioxisomas, la *isocitrato liasa* y la *malato sintasa*. A través del uso de estas dos enzimas, el ciclo del glioxilato se salta las dos reacciones de descarboxilación del ciclo del TCA. Además, el ciclo del glioxilato introduce no una, sino dos moléculas de acetil CoA por vuelta del ciclo, generándose succinato, una molécula de cuatro átomos de carbono. Así, el ciclo del glioxilato es anabólico (el carbono entra como molécula de dos átomos de carbono y lo abandona en forma de molécula de cuatro carbonos), mientras que el ciclo del TCA es catabólico (el carbono entra como una molécula de dos carbonos y lo abandona como 2 moléculas de CO_2).

En las semillas de las especies oleosas, las enzimas de la β-oxidación y del ciclo del glioxilato se localizan en orgánulos denominados **glioxisomas**. Los glioxisomas se encuentran en las semillas de las especies que almacenan grasa y algunas veces en las hojas viejas. En la micrografía electrónica de la Figura 10A.1 se pueden observar los glioxisomas. La íntima asociación de los glioxisomas con los cuerpos lipídicos, presumiblemente facilita el transporte de ácidos grasos desde estos últimos a aquéllos.

La Figura 10A.2 recoge todo el metabolismo relevante dentro del contexto intracelular. Los triacilgliceroles almacenados se hidrolizan en los cuerpos lipídicos, liberando ácidos grasos. Éstos se transportan dentro del glioxisoma y son degradados mediante la β-oxidación a acetil CoA, que es transformado en succinato por las enzimas del ciclo del glioxilato. El succinato pasa a la mitocondria, donde se convierte en malato pasando por fumarato en una reacción que forma parte del ciclo del TCA. (Dese cuenta de que existen también mitocondrias en el cotiledón del pepino de la Figura 10A.1.) El malato es transportado posteriormente al citosol y oxidado a oxalacetato, el cual es descarboxilado para formar

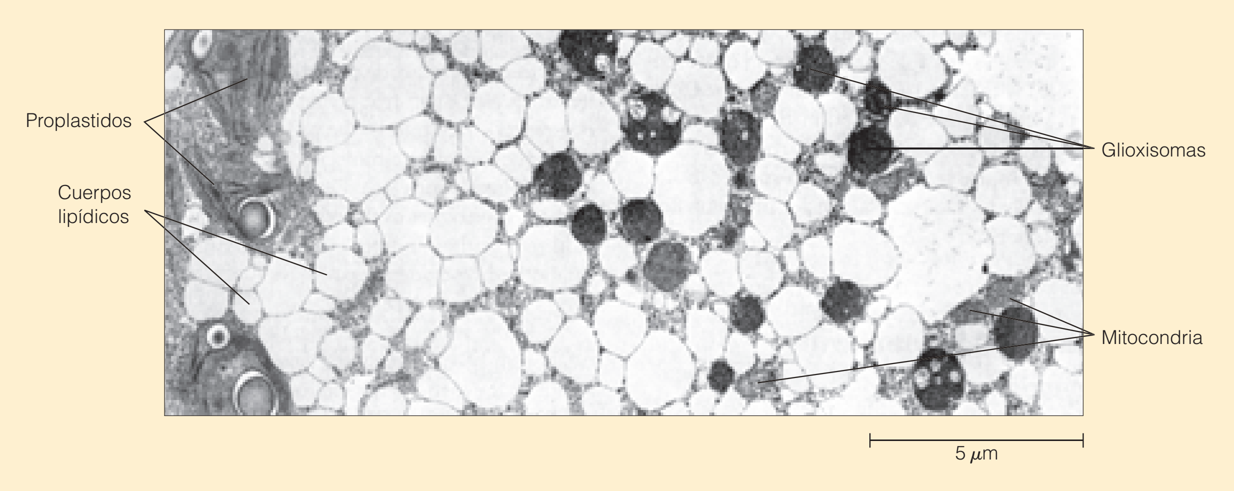


Figura 10A.1 La asociación entre los glioxisomas y los cuerpos lipídicos en las semillas oleaginosas. Aquí se muestra la célula de un cotiledón de una semilla de pepino durante las primeras etapas del desarrollo germinativo. Los glioxisomas y las mitocondrias implicadas en la movilización de grasas y en la gluconeogénesis están íntimamente asociadas con los cuerpos lipídicos en los que se almacena la grasa. La grasa está presente principalmente en forma de triacilgliceroles (también llamados triglicéridos). Se puede observar la presencia de proplastidios en vez de plastos maduros, lo que pone en evidencia que el cotiledón no es aún fotosintéticamente activo y es por lo tanto, heterotrófico en su modo de nutrirse (TEM).

fosfoenolpiruvato (PEP). El PEP sirve como punto de partida de la gluconeogénesis en el citosol, dando como producto final sacarosa, el carbohidrato por excelencia, que se transporta a los tejidos en crecimiento de la planta.

La ruta desde los triacilgliceroles hasta la sacarosa es obviamente bastante compleja, e implica a enzimas de los cuerpos lipídicos, de los glioxisomas, de la mitocondria y del citosol. Pero representa el cordón umbilical metabólico del que dependen las semillas de todas las especies de plantas que almacenan grasa. Y complementa gran parte del metabolismo que hemos estado viendo en los Capítulos 9 y 10, incluyendo la gluconeogénesis, el ciclo del TCA, la β-oxidación, y ahora también el ciclo del glioxilato.

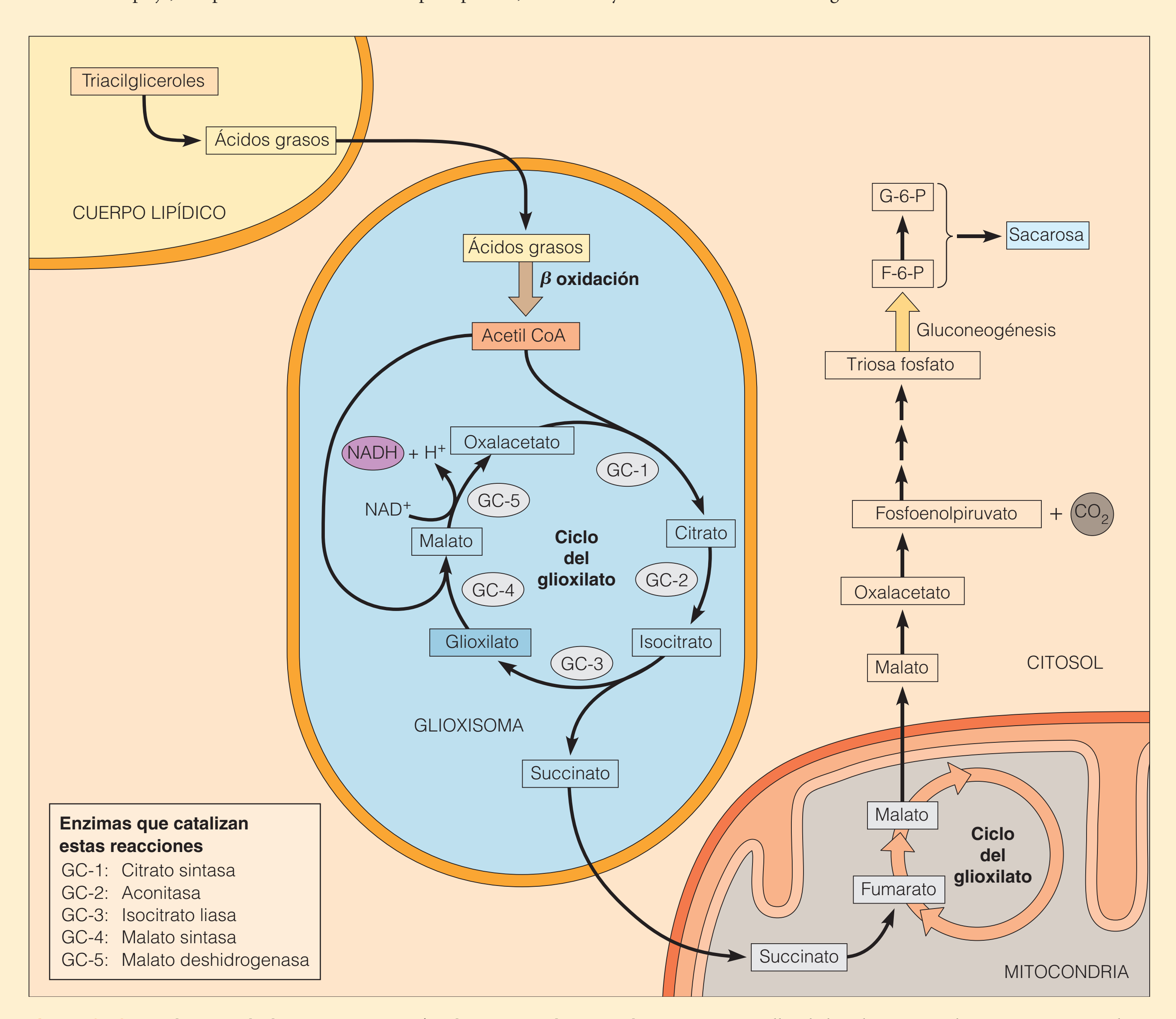


Figura 10A.2 El ciclo del glioxilato y la gluconeogénesis en las semillas oleaginosas. Las semillas de las plantas que almacenan grasa pueden transformar ésta en azúcar. Los ácidos grasos derivados de la hidrólisis de los triacilgliceroles almacenados, se oxidan a acetil CoA mediante el proceso de la β-oxidación. El acetil CoA se transforma después en succinato mediante el ciclo del glioxilato, una secuencia anabólica de cinco reacciones, que recibe su nombre del glioxilato, la molécula que se consume y se genera en las reacciones GC-3 y GC-4, respectivamente. Todas las enzimas de la β-oxidación y del ciclo del glioxilato se encuentran en el glioxisoma. La transformación de succinato en malato tiene lugar en la mitocondria, mientras que el metabolismo posterior del malato pasando por el fosfoenolpiruvato, a hexosas y por tanto, a sacarosa, tiene lugar en el citosol. En las semillas de las plantas que almacenan grasas, como la soja, el cacahuete, el maíz y el ricino, el acetil CoA proviene de la β-oxidación de ácidos grasos. En las bacterias y el los microorganismos eucariotas capaces de crecer sobre sustratos de dos carbonos como el etanol o el acetato, el acetil CoA se genera a partir del acetato libre, en una fosforilación dependiente de ATP.

El sistema de transporte de electrones conduce los electrones desde las coenzimas reducidas al oxígeno

Evidentemente, buena parte de la energía liberada por el catabolismo oxidativo de los carbohidratos, grasa o proteínas se almacena en las coenzimas reducidas de elevada energía que se producen en este proceso. Es más, estos procesos oxidativos pueden continuar únicamente si hay moléculas de coenzimas oxidadas disponibles como aceptores de electrones. Esto, a su vez, depende de la reoxidación continua de coenzimas reducidas mediante la transferencia de electrones a un aceptor terminal de electrones —O_2, en el caso de la respiración aerobia.

El transporte de electrones y la oxidación de las coenzimas. El transporte de electrones implica la oxidación altamente exergónica del NADH y de $FADH_2$ con el oxígeno como aceptor terminal de electrones, pudiendo escribir las reacciones globales de la manera siguiente:

$$NADH + H^+ + \tfrac{1}{2}O_2 \longrightarrow NAD^+ + H_2O \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -52{,}4 \text{ kcal/mol} \quad \textbf{(10.4)}$$

$$FADH_2 + \tfrac{1}{2}O_2 \longrightarrow FAD + H_2O \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -45{,}9 \text{ kcal/mol} \quad \textbf{(10.5)}$$

El transporte de electrones, por lo tanto, no sólo conlleva la reoxidación de las coenzimas y el consumo de oxígeno, sino también la liberación de agua, que es la forma reducida del oxígeno y uno de los dos productos finales del metabolismo energético aerobio. (El otro producto final es el dióxido de carbono producido en el ciclo del TCA; *véanse* la Figura 10.8 y la Reacción 10.19.)

El sistema de transporte de electrones. El aspecto más importante de las Reacciones 10.4 y 10.5 es la gran cantidad de energía libre desprendida durante la oxidación del NADH y del $FADH_2$ por la transferencia de electrones al oxígeno. Los valores de $\Delta G^{\circ\prime}$ de estas reacciones dejan claro que la oxidación de una coenzima es un proceso altamente exergónico. La transferencia de electrones se lleva a cabo en un proceso de muchos pasos, que implica una serie de transportadores de electrones oxidables reversiblemente que funcionan conjuntamente en lo que se ha llamado **cadena de transporte de electrones** (ETS). De esta manera, la gran diferencia de energía libre entre las coenzimas reducidas y el oxígeno está repartida en una serie de transferencias de electrones y se libera de manera gradual, llevando al máximo las oportunidades para la síntesis de ATP y minimizando la pérdida de energía en forma de calor.

Nuestro análisis del sistema de transporte de electrones se centrará en tres cuestiones: (1) ¿Cuáles son los principales transportadores de electrones en la ETS? (2) ¿Cuál es la secuencia de estos transportadores en la cadena? (3) ¿Cómo se organizan estos transportadores en la membrana, para garantizar que el flujo de electrones desde las coenzimas reducidas al oxígeno, esté acoplado al bombeo de protones a través de la membrana, produciéndose de esta manera el gradiente electroquímico de protones del que depende la síntesis de ATP?

El sistema de transporte de electrones consiste en cinco tipos diferentes de transportadores

Los transportadores que constituyen el sistema son *flavoproteínas, ferrosulfoproteínas, citocromos, citocromos* que contienen cobre y una quinona denominada *coenzima Q*. Excepto la coenzima Q, todos los transportadores son proteínas con grupos prostéticos específicos capaces de ser oxidados y reducidos reversiblemente. Casi todas las transferencias de electrones ocurren en las membranas, por lo que no es sorprendente que la mayor parte de estos transportadores sean moléculas hidrófobas. De hecho, la mayoría de estos intermediarios aparecen en la membrana como parte de grandes complejos de proteínas llamados *complejos respiratorios*. Echaremos un vistazo a la química de estos transportadores de electrones y después veremos cómo se organizan en complejos respiratorios y se ordenan en una cadena de transportadores, que transfieren los electrones desde las coenzimas reducidas al oxígeno.

Flavoproteínas. En el transporte de electrones participan varias flavoproteínas unidas a membrana, que usan como grupo prostético, bien al *dinucleótido de flavina adenina (FAD)*, bien al *mononucleótido de flavina (FMN)*. El FMN es, en esencia, media molécula de FAD, como se muestra en la Figura 10.9. Un ejemplo de flavoproteína es la NADH deshidrogenasa, que forma parte del complejo proteico que acepta los pares de electrones que provienen del NADH. Otro ejemplo, ya conocido por nosotros del ciclo del TCA, es la enzima succinato deshidrogenasa, que tiene al FAD como grupo prostético y forma parte de un complejo respiratorio unido a membrana, que acepta los pares de electrones del succinato a través del FAD. Una característica importante de las flavoproteínas (y de la coenzima NADH también) es que transfieren, tanto protones, como electrones a medida que son oxidados y reducidos reversiblemente.

Ferrosulfoproteínas. Las **ferrosulfoproteínas**, también llamadas *ferredoxinas (proteínas férricas sin grupo hemo)*, forman parte de una familia de proteínas, cada una con un *centro ferrosulfuroso (Fe-S)*, que consiste en átomos de hierro y azufre asociados con los grupos cisteína de la proteína. Se conocen, al menos, una docena de centros Fe-S que participan en el sistema mitocondrial de transporte de electrones. Los átomos de hierro de estos centros son los verdaderos transportadores. Cada átomo de hierro alterna entre la forma oxidada (Fe^{3+}) y la reducida (Fe^{2+}) durante el transporte de electrones, que en este caso afecta a un único electrón. Es más, las proteínas ferrosulfurosas no

toman o ceden protones mientras cambian entre los estados oxidados y los reducidos, un aspecto cuya importancia se hará patente más adelante.

Citocromos. Al igual que las ferrosulfoproteínas, los citocromos también contienen hierro, pero formando parte del grupo prostético de una porfirina llamado *hemo*, al que probablemente uste reconozca como componente de la hemoglobina (*véanse* Figuras 3.4 y 10.12). Existen, al menos, cinco tipos diferentes de citocromos en el sistema de transporte de electrones, designados como citocromos *b, c,* c_1, *a* y a_3. El átomo de hierro del grupo prostético hemo, al igual que el del centro ferrosulfuroso, sirve como transportador de electrones en los citocromos. Así, los citocromos son también transportadores de un único electrón, sin transferir protones. Mientras que los citocromos *b,* c_1, *a* y a_3 son proteínas integrales de membrana, el citocromo *c* es una proteína periférica de membrana, asociada indirectamente a la cara externa de ésta. Es más, el citocromo *c* no forma parte de un gran complejo y puede por tanto difundir mucho más rápidamente, una propiedad clave para desempeñar su papel en la transferencia de electrones entre complejos proteicos.

Citocromos que contienen cobre. Además de sus átomos de hierro, los citocromos *a* y a_3 también contienen un átomo de cobre unido al grupo hemo del citocromo, donde se encuentra asociado con un átomo de hierro para formar un **centro bimetálico hierro-cobre (Fe-Cu)**. De la misma manera que los átomos de hierro, el cobre también puede convertirse reversiblemente de la forma oxidada (Cu^{2+}) a la reducida (Cu^{+}) aceptando o donando electrones. El centro hierro-cobre desempeña un papel crucial manteniendo una molécula de O_2 unida al complejo citocromo oxidasa hasta que haya tomado los cuatro electrones y los cuatro protones requeridos, momento en el que el O_2 se libera como dos moléculas de agua. (Un dato nutricional: si alguna vez se ha preguntado para qué necesita los elementos cobre y hierro en la dieta, el transporte de electrones es un buen ejemplo.)

Coenzima Q. La **coenzima Q (CoQ)**, el único componente no proteico de la ETS, es una quinona cuya estructura se muestra en la Figura 10.13. Debido a su carácter ubicuo en la naturaleza, se conoce a la coenzima Q como *ubiquinona.* La Figura 10.13 ilustra también la reducción reversible, en

Grupos vinilo

HEMO

Figura 10.12 La estructura del grupo hemo. El grupo hemo, también llamado ferroprotoporfirina IX, es el grupo prostético en los citocromos *b, c,* y c_1. Una molécula parecida, llamada hemo A, está presente en los citocromos *a* y a_3. El hemo de los citocromos *c,* y c_1 está unido covalentemente a la proteína mediante enlaces tioéster entre los grupos sulfhidrilo de dos cisteínas de la proteína y grupos vinilo (—CH═CH_2) del hemo (destacados en amarillo). En los otros citocromos, el grupo prostético hemo está unido de forma no covalente a la proteína.

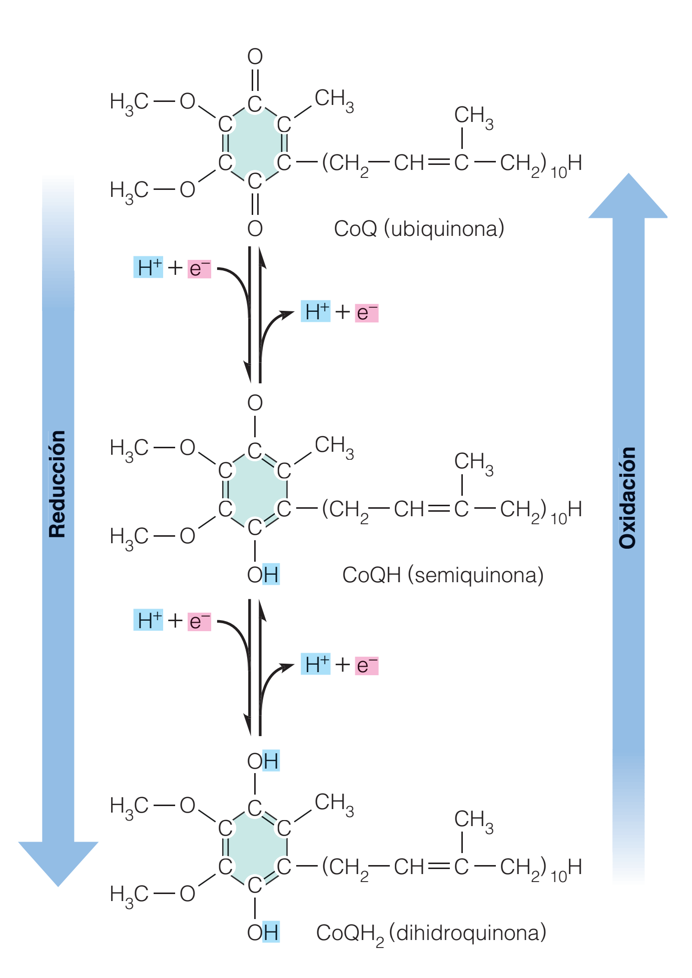


Figura 10.13 Las formas oxidadas y reducidas de la coenzima Q. La coenzima Q (también llamada ubiquinona) acepta tanto electrones como protones según va siendo reversiblemente reducido en dos pasos sucesivos de un electrón cada uno, formándose primero CoQH (la forma semiquinona) y posteriormente $CoQH_2$ (la forma dihidroquinona).

dos pasos de un electrón, desde la forma quinona (CoQ) a la forma *dihidroquinona* ($CoQH_2$), pasando antes por la forma *semiquinona* (CoQH). A diferencia de la mayoría de las proteínas de la ETS, la coenzima Q no forma parte de un complejo respiratorio, sino que se encuentra en el interior apolar de la membrana mitocondrial interna (o de la membrana plasmática, en el caso de procariotas). Las moléculas de CoQ son los transportadores de electrones más abundantes en la membrana y ocupan un lugar central en la ETS, sirviendo como un punto de recolección de electrones desde los grupos prostéticos reducidos de las deshidrogenasas unidas al FMN o al FAD en la membrana.

Dese cuenta de que la coenzima Q no sólo acepta los electrones cuando se reduce, sino también los protones y que libera, tanto los electrones, como los protones cuando se oxida. Esta propiedad es crucial en la función de la coenzima Q en el transporte activo, o bombeo, de protones a través de la membrana mitocondrial interna. Cuando la CoQ se reduce a $CoQH_2$, acepta siempre los protones desde un lado de la membrana, posteriormente difunde a través de ella hacia la superficie externa, donde se oxida a CoQ, propulsando los protones hacia el otro lado de la membrana. Esto proporciona una bomba de protones acoplada al transporte de electrones, que es uno de los mecanismos por los que se piensa que las mitocondrias, los cloroplastos y los procariotas establecen y mantienen un gradiente electroquímico de protones que se usa para almacenar la energía del transporte de electrones.

Los transportadores de electrones funcionan en una secuencia que viene determinada por sus potenciales de reducción

Ahora que conocemos los tipos de transportadores que conforman la ETS, nuestra siguiente pregunta hace referencia a la secuencia en que estos transportadores operan. Para ello, es preciso que entendamos qué significa el **potencial de reducción estándar, E_0'**, que es una medida, en voltios (V), de la afinidad que tiene un compuesto por los electrones. Describe la facilidad de un compuesto para ganar electrones y reducirse. Los potenciales de reducción se determinan experimentalmente por un **par redox (reducción-oxidación)**, que consiste en dos moléculas que son interconvertibles por la pérdida o ganancia de electrones. Por ejemplo, el NAD^+ y el NADH constituyen un par redox, al igual que el Fe^{2+} y el Fe^{3+}, o el $\frac{1}{2}O_2$ y el H_2O, como se muestra en las Ecuaciones 10.6 a 10.8.

$$NAD^+ + H^+ + 2e^- \longrightarrow NADH \qquad \textbf{(10.6)}$$

$$Fe^{3+} + e^- \longrightarrow Fe^{2+} \qquad \textbf{(10.7)}$$

$$\tfrac{1}{2}O_2 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2O \qquad \textbf{(10.8)}$$

Los valores relativos de E_0' nos permiten comparar pares redox y predecir en qué dirección tenderán a fluir los electrones cuando varios pares redox estén presentes en un mismo sistema, como es el caso del sistema de transporte de electrones.

Como se ha descrito anteriormente, el potencial de reducción es una medida de la afinidad por los electrones, que tiene la forma oxidada de un par redox. Tener un valor positivo de E_0' para un par redox significa que la forma oxidada tiene una gran afinidad por los electrones, y constituye, por tanto, un buen *aceptor* de electrones. Por ejemplo, el valor de E_0' para el par O_2/H_2O es altamente positivo, lo que significa que el O_2 es un buen aceptor de electrones. Por su parte, el par NAD^+/NADH tiene un valor de E_0' muy negativo, lo que quiere decir que el NAD^+ es un aceptor de electrones malo. Por otro lado, un valor negativo de E_0' puede ser visto como una medida de la capacidad como donador de electrones, que tiene la forma reducida de un par redox. De esta manera, el valor de E_0' tan negativo del par NADH significa que el NADH constituye un buen donador de electrones.

Conocimientos de los potenciales de reducción estándar. Para estandarizar los cálculos y las comparaciones de los potenciales de reducción de varios pares redox, necesitamos valores determinados bajo condiciones específicas. Con este propósito, usaremos el potencial de reducción estándar (E_0'), que es el potencial de reducción para un par redox bajo condiciones estándar (25 °C, 1 *M* de concentración, 1 atmósfera de presión y un pH de 7,0). Los potenciales de reducción de los pares redox más relevantes se muestran en la Tabla 10.2.

Por convención, se usa el par redox $2H^+/H_2$ como referencia, al que se le asigna el valor de 0,00 V (Tabla 10.2, línea en negrita). Un par redox que tenga un potencial de reducción estándar positivo significa que, bajo condiciones estándar, la forma oxidada del par posee una afinidad mayor por los electrones que el H^+ y que aceptará los electrones del H_2. En cambio, un potencial de reducción negativo quiere decir que la forma oxidada del par tiene menos afinidad por los electrones que el H^+ y que por lo tanto donará los electrones al H^+ para formar H_2.

Los pares redox de la Tabla 10.2 están colocados en orden, con los valores de E_0' más negativos (es decir, los mejores donadores de electrones y, por tanto, los agentes reductores más fuertes) en la parte superior. Todos los pares redox que se muestran en la Figura 10.2 pueden llevar a cabo una reacción redox con cualquier otro par. El sentido de dicha reacción bajo condiciones estándar puede predecirse, porque, *la forma reducida de cualquier par redox reducirá espontáneamente la forma oxidada de cualquier par que se encuentre por debajo de él en la tabla.* De esta manera, el NADH puede reducir al piruvato a lactato, pero no puede mediar la reducción del α-cetoglutarato a isocitrato.

La tendencia de una forma reducida de un par a reducir la forma oxidada de otro par puede cuantificarse deter-

Tabla 10.2 Potenciales de reducción para los pares redox de importancia biológica*

Pares redox (forma oxidada → forma reducida)	N.º de electrones	E_0'(V)
Acetato → piruvato	2	−0,70
Succinato → α-cetoglutarato	2	−0,67
Acetato → acetaldehído	2	−0,60
3-fosfoglicerato → gliceraldehído 3-P	2	−0,55
α-cetoglutarato → isocitrato	2	−0,38
NAD^+ → NADH	2	−0,32
FMN → $FMNH_2$	2	−0,30
1,3-difosfoglicerato → gliceraldehído 3-P	2	−0,29
Acetaldehído → etanol	2	−0,20
Piruvato → lactato	2	−0,19
FAD → $FADH_2$	2	−0,18
Oxalacetato → malato	2	−0,17
Fumarato → succinato	2	−0,03
$2H^+$ → H_2	**2**	**0,00****
CoQ^+ → $CoQH_2$	1	+0,04
Citocromo *b* (Fe^{3+} → Fe^{2+})	2	+0,07
Citocromo *c* (Fe^{3+} → Fe^{2+})	1	+0,25
Citocromo *a* (Fe^{3+} → Fe^{2+})	1	+0,29
Citocromo a_3 (Fe^{3+} → Fe^{2+})	1	+0,55
Fe^{3+} → Fe^{2+} (ion inorgánico)	1	+0,77
$^1/_2O_2$ → H_20	1	+0,816

* El valor de $\Delta E_0'$ corresponde a la siguiente hemirreacción, donde *n* es el número de electrones transferidos:

Forma oxidada + nH^+ + ne^- → forma reducida

** Por definición, este par redox es el punto de referencia que se usa para determinar los valores de los otros pares redox; se requiere que $[H^+] = 1,0\ M$ y por tanto, el pH es 0,0. A un pH de 7,0, el valor del par 2 H^+/H_2 es −0,42.

minando $\Delta E_0'$, la diferencia entre los valores de E_0' entre dos pares:

$$\Delta E_0' = E_0'_{\text{aceptor}} - E_0'_{\text{donador}} \qquad \textbf{(10.9)}$$

Por ejemplo, $\Delta E_0'$ para la transferencia de electrones desde NADH al O_2 (Reacción 10.4) se calcula de la manera siguiente, con el NADH como donador y el O_2 como aceptor:

$$\Delta E_0' = E_0'_{\text{aceptor}} - E_0'_{\text{donador}} = +0{,}816 - (-0{,}32) = +1.136\text{ V} \qquad \textbf{(10.10)}$$

La relación entre $\Delta G°'$ y $\Delta E°'$. Como ya habrá podido imaginar, $\Delta E_0'$ es una medida de la esponteanidad de la reacción redox entre dos pares redox cualquiera en condiciones estándar. La espontaneidad de una reacción redox en condiciones estándar puede expresarse como $\Delta G_0'$ o $\Delta E_0'$. Por convención el signo de $\Delta E_0'$ es el contrario del de $\Delta G_0'$, de tal manera que una reacción exergónica es aquélla con un valor negativo de $\Delta G_0'$ y positivo de $\Delta E_0'$. Para cualquier reacción de oxidación-reducción, $\Delta G_0'$ está relacionado con $\Delta E_0'$ mediante la ecuación:

$$\Delta G_0' = -nF\,\Delta E_0' \qquad \textbf{(10.11)}$$

donde *n* es el número de electrones transferido y *F* es la constante de Faraday (23.062 cal/mol). Por ejemplo, la reacción del NADH con el oxígeno (Reacción 10.4) implica la transferencia de dos electrones, por lo que la $\Delta G_0'$ de esta reacción puede calcularse de la siguiente manera

$$\Delta G_0' = -2F\,\Delta E_0' = -2(23.062)(+1.136) = 52{,}400\text{ cal/mol} = 52{,}4\text{ kcal/mol} \qquad \textbf{(10.12)}$$

El valor de esta reacción es negativo, por lo que la transferencia de electrones desde el NADH al O_2 es termodinámicamente espontánea bajo condiciones estándar. Es, de hecho, la diferencia de potenciales de reducción entre los pares redox NAD^+/NADH y O_2/H_2O, la que dirige la ETS y mantiene el gradiente electroquímico de protones.

Reuniendo el sistema de transporte de electrones. En este momento disponemos de la información necesaria para juntar las piezas de la ETS. Como ya sabemos, consiste en varias deshidrogenasas unidas al FMN y al FAD, proteínas ferrosulfurosas con un total de 12 o más centros Fe/S, cinco citocromos, dos de ellos con un centro Fe/S, y un conjunto de moléculas de CoQ que se encuentran en una forma oxidada (CoQ), parcialmente reducida (CoQH) o en la forma reducida ($CoQH_2$). En la Figura 10.14 se muestran los principales componentes de la ETS ordenados en función de sus potenciales de reducción estándar (los valores de $\Delta E_0'$ están calculados según la Tabla 10.2), desde el NADH libre ($E_0' =$ −0,32V) y el del $FADH_2$ de la succinato deshidrogenasa ($E_0' =$ −0,18V) al oxígeno ($E_0' =$ +0,816V).

En términos de energía, el punto clave de la Figura 10.14 es que la posición de cada transportador está determinado por su potencial de reducción estándar. En otras palabras, el sistema de transporte de electrones consiste en una serie de transportadores que difieren químicamente entre sí y cuyo orden de partipación en la transferencia de electrones está determinada por sus potenciales de reducción relativos. A su vez, esto quiere decir que la transferencia de electrones desde el NADH o el $FADH_2$ en la parte superior al O_2 en la parte inferior es espontánea y exergónica, con algunas de las transferencias entre transportadores sucesivos caracterizadas por grandes diferencias en sus valores de E_0' y en consecuencia por grandes cambios en la energía libre.

La mayoría de los transportadores están organizados en cuatro grandes complejos respiratorios

Aunque existen muchos transportadores de electrones implicados en la ETS, la mayor parte de ellos no se encuentran

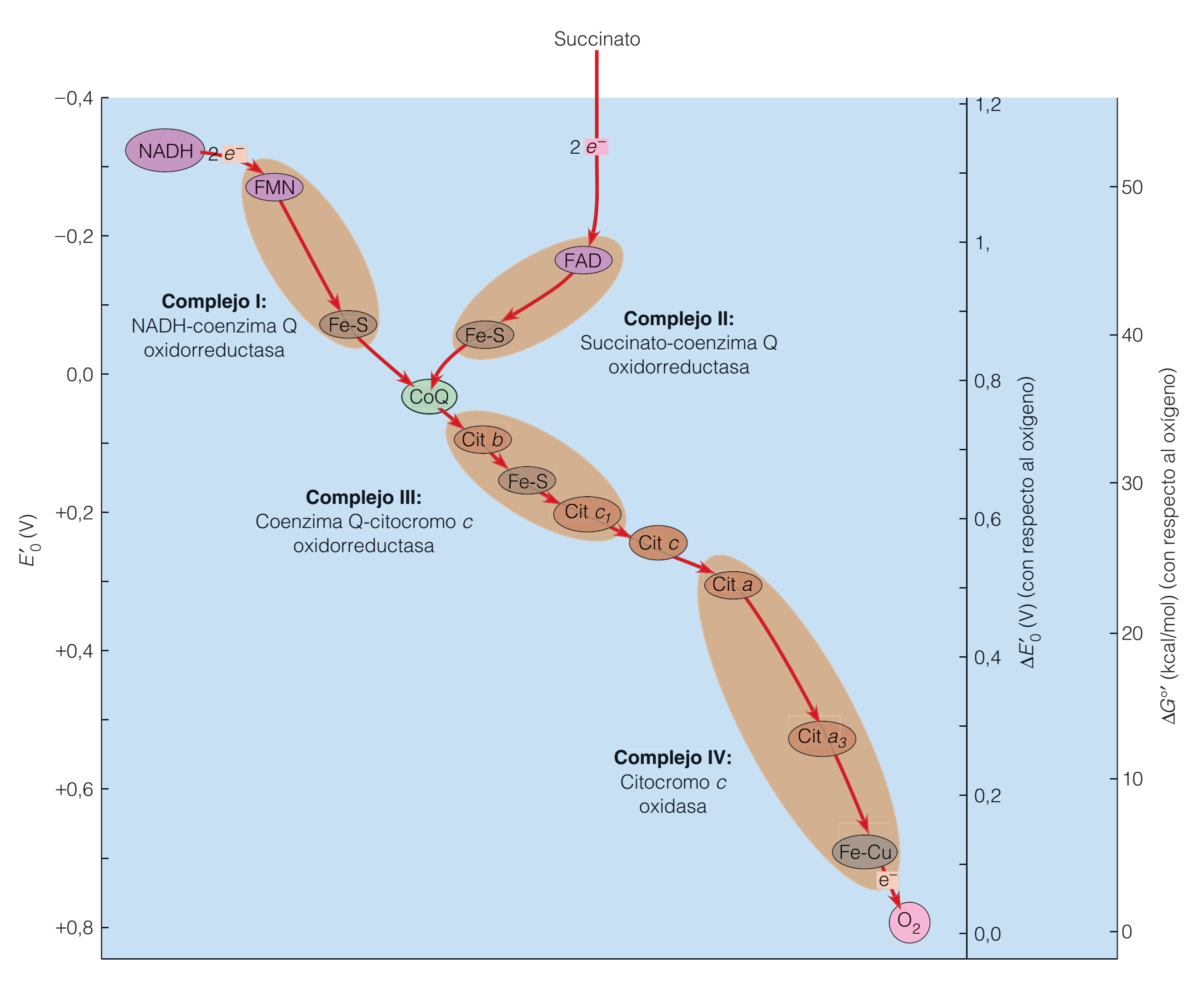


Figura 10.14 **Principales componentes de los complejos respiratorios y sus energéticas.** Los intermediarios más importantes en el transporte de electrones desde el NADH (−0,32 V) se colocan verticalmente en función de sus niveles energéticos, que se miden por sus potenciales de reducción estándar (E_0', eje izquierdo). Se muestran los cuatro complejos respiratorios como grandes óvalos marrones, que contienen los principales transportadores de electrones encuadrados en otro óvalo interior. La coenzima Q y el citocromo *c* son intermediarios móviles y pequeños que transfieren los electrones entre varios complejos. Las líneas rosas marcan el flujo exergónico de electrones a lo largo del sistema. En los ejes de la derecha se encuentran los valores de $\Delta E_0'$ y $\Delta G_0'$ del oxígeno (es decir, los cambios en los potenciales de reducción estándar y la energía libre estándar de la transferencia de electrones al O_2).

en la membrana como entidades individuales. Al contrario, el comportamiento de estos transportadores en experimentos de aislamiento mitocondrial indican que están organizados en *complejos multiproteicos.* Por ejemplo, cuando se extraen membranas mitocondriales mediante procedimientos delicados, sólo la coenzima Q y el citocromo *c* se liberan fácilmente. Los demás transportadores permanecen unidos a la membrana interna y no se liberan, a no ser que se trate a la membrana con detergentes o con soluciones salinas concentradas. Dichos tratamientos extraen el resto de los transportadores de electrones no como moléculas individuales sino como cuatro grandes complejos.

Basándose en éstos y otros resultados similares, se piensa que los transportadores de electrones en la ETS están organizados en la membrana mitocondrial interna en cuatro tipos diferentes de **complejos respiratorios.** Estos complejos se muestran en la Figura 10.14 en forma de óvalos marrones y con números romanos, que indican no sólo el orden de los diferentes transportadores de electrones en función de sus valores de E_0' sino también su organización en la membrana.

Propiedades de los complejos respiratorios. Cada complejo respiratorio está formado por la unión de polipéptidos y grupos prostéticos, y cada uno desempeña una única función en el proceso del transporte de electrones. La Tabla 10.3 recoge algunas de las propiedades de estos complejos.

Tabla 10.3 Propiedades de los complejos respiratorios mitocondriales

Complejo respiratorio				Flujo de electrones		
Número	Nombre	Número de polipéptidos*	Grupos prostéticos	Aceptado de	Pasado a	Protones translocados (por par de electrones)
I	NADH–coencima Q oxirreductasa (NADH deshidrogenasa)	43 (7)	1 FMN 6–9 centros Fe-S	NADH	Coenzima Q	4
II	Succinato–coenzima Q oxidorreductasa (succinato deshidrogenasa)	4 (0)	1 FAD 3 Fe-S centros	Succinato a través de enzima unida a FAD)	Coenzima Q	0
III	Coenzima Q–citocromo *c* oxidorreductasa (complejo citocromo b-c_1)	11 (1)	2 citocromo *b* 1 citocromo c_1 1 centro Fe-S	Coenzima Q	Citocromo *c*	4**
IV	Citocromo *c* oxidasa	13 (3)	1 citocromo *a* 1 citocromo a_3 2 centros Cu (como centros Fe-Cu con el citocromo a_3)	Citocromo *c*	Oxígeno (O_2)	2

*En cada complejo se indica entre paréntesis el número de polipéptidos codificado por el genoma mitocondrial.

**El valor del complejo III incluye 2 protones translocados por la coenzima Q.

El **complejo I** transfiere los electrones desde el NADH a la coenzima Q y se denomina **complejo NADH-coenzima Q oxidorreductasa** (o *complejo NADH deshidrogenasa*). El complejo II transfiere a la CoQ los electrones derivados del succinato de la reacción TCA-6. Este complejo se conoce formalmente como complejo **succinato-coenzima Q oxidorreductasa**, aunque frecuentemente se utiliza el nombre abreviado, *succinato deshidrogenasa.* El **complejo III** se denomina **complejo coenzima Q-citocromo oxidorreductasa** porque acepta los electrones de la coenzima Q y los pasa al citocromo *c*. A veces, se hace referencia a este complejo como citocromo b/c_1 porque son estos dos citocromos sus principales componentes. El **complejo IV** transfiere los electrones desde el citocromo *c* al oxígeno y se llama **citocromo *c* oxidasa**.

La Figura 10.15 muestra los tres complejos necesarios para la oxidación del NADH (complejos I, III y IV) en su apropiado contexto eurocariota, la membrana mitocondrial interna (no se incluye el complejo II en la figura porque éste no participa en la oxidación del NADH). También se muestra en la figura el bombeo hacia el exterior de protones a través de la membrana, que acompaña al transporte de electrones. Cada uno de estos complejos representa un punto de bombeo de protones. El paso de electrones a través del complejo II no está asociado a una translocación de protones a través de la membrana.

La función de la citocromo *c* oxidasa. Entre todos los complejos respiratorios que participan en la respiración aerobia en el hombre, sólo la citocromo *c* oxidasa, al final del sistema de transporte de electrones, es una **oxidasa terminal,** capaz de transferir directamente los electrones al oxígeno. Este complejo representa, por tanto, el nexo crucial entre la respiración aerobia y el oxígeno que hace todo esto posible. Los iones de cianida y azida son extremadamente tóxicos para casi todas las células aerobias porque se unen fuertemente al centro de hierro-cobre de la citocromo *c* oxidasa, y bloquean, por lo tanto, el transporte de electrones.

Los complejos respiratorios se mueven libremente dentro de la membrana interna

A diferencia de ciertas proteínas integrales de la membrana plasmática, los complejos proteicos de la membrana mitocondrial interna son móviles y pueden difundir libremente a lo largo del plano de la membrana. Esta difusión puede demostrarse experimentalmente. En un experimento, por ejemplo, se colocaron las membranas mitocondriales internas en un campo eléctrico y se analizó la distribución posteriormente mediante criofractura. Se observó que las partículas que correspondían a los complejos proteicos se acumulaban en un extremo de la membrana. Cuando se interrumpía el campo eléctrico, las partículas se distribuían aleatoriamente en cuestión de segundos, demostrando claramente la capacidad de difundir libremente en una bicapa lipídica.

Los resultados de éste y de otros experimentos demuestran que los complejos respiratorios no se están alineados en una membrana de la manera ordenada que muestran los libros de texto, sino que son complejos móviles en la membrana. De hecho, la membrana mitocondrial interna posee una elevada proporción de fosfolípidos insaturados con respecto a los saturados y no tiene casi colesterol, por

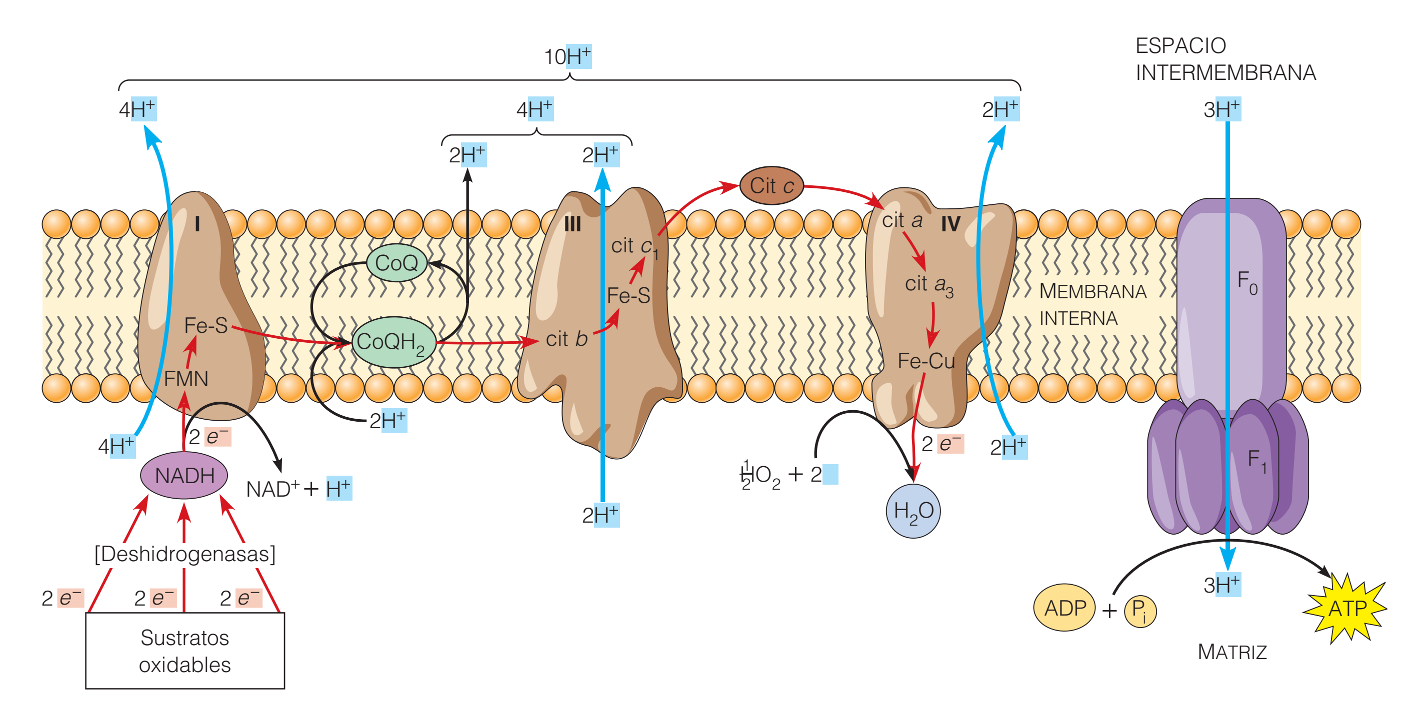


Figura 10.15 El flujo de electrones a través de los complejos I, III y IV con el concomitante bombeo direccional de protones. Los electrones derivados de los sustratos oxidables en la matriz mitocondrial se transportan a la superficie de la membrana interna gracias al NADH, mediante un flujo exergónico desde el NADH al oxígeno, a través de los complejos respiratorios I, III y IV. Las transferencias de electrones entre los complejos I y II y entre los III y IV, están mediadas por la coenzima Q (CoQ) y el citocromo *c* (cit *c*), respectivamente. En cada complejo se muestran los principales transportadores de electrones; la mayoría de ellos son proteínas Fe-S o citocromos. También se indica el número de protones bombeados desde la matriz al espacio intermembrana por cada par de electrones transferidos por cada complejo. Estos números representan los valores admitidos por la mayoría de los investigadores en cada caso. El número de protones requerido para la síntesis de una molécula de ATP por la ATP sintasa F_oF_1 se encuentra entre 3 y 4; en este capítulo, se asumirá un valor de 3 a la hora de realizar cálculos energéticos.

lo que presenta una elevada fluidez y consecuentemente, los complejos respiratorios poseen una gran movilidad.

Frecuentemente suele hacerse referencia al sistema de transporte de electrones como una «cadena». Ésta es una descripción acertada si la entendemos en el sentido de que el flujo neto de electrones ocurre desde el NADH a la citocromo oxidasa y que cada transportador de la secuencia puede interaccionar únicamente con el componente del que recibe los electrones y con el componente al que se los dona. Sin embargo, el término «cadena» *no* es apropiado si sugiere algún tipo de localización fija o secuencia ordenada de los transportadores dentro de la membrana. Al contrario, cada complejo difunde aleatoriamente, al igual que las moléculas de coenzima Q y el citocromo *c* que transportan los electrones entre ellos.

Como se indica en la Figura 10.14, el NADH, la coenzima Q y el citocromo c son intermediarios clave en el proceso de transferencia de electrones. El NADH une la ETS con las reacciones de deshidrogenación (oxidación) del ciclo del TCA y con casi cualquier otra reacción de oxidación que tenga lugar en la matriz mitocondrial (o en el citoplasma, en el caso de las células procariotas), donde la coenzima Q y el citocromo *c* transfieren electrones entre complejos respiratorios. La coenzima Q acepta los electrones tanto del complejo I como del II, y representa de hecho, el «embudo» que recoge los electrones de casi cualquier reacción de oxidación de la célula. La coenzima Q y el citocromo *c* son moléculas relativamente pequeñas que pueden difundir rápidamente, ya sea dentro de la membrana (coenzima Q) como por la superficie de ésta (citocromo *c*). Son, además, muy numerosas —se ha estimado que existen alrededor de 10 moléculas de citocromo *c* y 50 moléculas de ubiquinona por cada complejo I—. Debido a su abundancia y movilidad, estos transportadores colisionan con los complejos principales con la suficiente frecuencia para explicar las tasas de transferencia de electrones observadas en la mitocondria con respiración activa.

El gradiente electroquímico de protones: la clave para el acoplamiento de energía

Hasta ahora, hemos aprendido que las coenzimas se reducen durante los procesos oxidativos que tienen lugar durante la glucolisis y el ciclo del TCA, la primera y segunda etapas de la respiración aerobia (etapas 1 y 2 de la Figu-

ra 10.1b). También hemos aprendido que las coenzimas reducidas son reoxidadas mediante la transfererencia exergónica de electrones al oxígeno, a través de un sistema de intermediarios que pueden oxidarse reversiblemente y que están localizados en la membrana mitocondrial interna (etapa 3a). Ahora consideraremos cómo se usa la energía libre liberada durante el transporte de electrones para generar un gradiente electroquímico de protones y cómo se utiliza la energía del gradiente para promover la síntesis de ATP. Según la Figura 10.1b, estamos a punto de estudiar la etapa 3b (bombeo de protones) y la etapa 4 (síntesis de ATP) de la respiración aerobia.

Dado que es una forma de síntesis de ATP que implica procesos de fosforilación asociados al transporte de electrones dependiente del oxígeno, el proceso se denomina **fosforilación oxidativa,** para diferenciarla de la fosforilación desde el de sustrato, que tiene lugar como parte integral de una reacción específica en una ruta metabólica (algunos ejemplos de estas fosforilaciones en el nivel de sustrato son las reacciones Gly-7 y Gly-10 de la ruta de la glucolisis y las reacciones TCA-5 del ciclo del TCA; *véanse* Figuras 9.6 y 10.8).

El transporte de electrones y la síntesis de ATP son fenómenos asociados

Desde un punto de vista mecanístico, la fosforilación oxidativa es un proceso de mayor complejidad que la fosforilación desde sustratos. De hecho, ha sido un asunto de gran controversia y confusión durante sus 60 años de historia, llevando a Efraim Racker, un científico de renombre en el campo, a comentar en un determinado momento que «Aquel que no esté confundido respecto a la fosforilación oxidativa es que simplemente, no comprende la situación». Actualmente, sin embargo, sabemos que el nexo crucial entre el transporte de electrones y la producción de ATP es un **gradiente electroquímico de protones** que se establece por el bombeo direccional de protones a través de la membrana en la que está ocurriendo el transporte de electrones. El término **acoplamiento** significa que dos procesos son dependientes uno del otro. Decir que el transporte de electrones y la síntesis de ATP están acoplados no sólo quiere decir que la síntesis de ATP depende críticamente del flujo de electrones, sino que además el flujo de electrones es únicamente posible cuando puede sintetizarse el ATP.

Control respiratorio del transporte de electrones. Ya que el transporte de electrones está acoplado a la síntesis de ATP, la disponibilidad de ADP regula la tasa de la fosforilación oxidativa y, por lo tanto, el transporte de electrones. Esto es lo que se llama **control respiratorio**, y su importancia fisiológica es fácilmente apreciable: el transporte de electrones y la producción de ATP estarán favorecidos cuando la concentración de ADP es elevada (es decir, cuando la concentración de ATP es baja) y están inhibidos cuando la concentración de ADP es baja (cuando la concentración de ATP es alta). La fosforilación oxidativa está, por tanto, regulada por las necesidades celulares de ATP, de la misma manera que el flujo de electrones desde las moléculas orgánicas combustibles al oxígeno está ajustado a los requerimientos energéticos de la célula. Este mecanismo de regulación se hace patente durante el ejercicio, cuando la acumulación de ADP en el tejido muscular causa un incremento en la tasa de transporte de electrones, seguido por un dramático aumento en las exigencias de oxígeno.

El modelo quimiosmótico: el «eslabón perdido» es un gradiente de protones

¿De qué manera puede estar la síntesis de ATP, una reacción de deshidratación, acoplada al transporte de electrones, que implica la oxidación y reducción secuencial de varios complejos proteicos en una bicapa lipídica? Los científicos han dado muchas vueltas a esta cuestión, pero la respuesta ha resistido sus mejores esfuerzos durante décadas. La mayoría estaban convencidos de que en la fosforilación oxidativa tendrían que estar implicados sin duda intermediarios de alta energía, de la misma manera que lo están en la fosforilación desde sustratos como las que tienen lugar durante las etapas productoras de ATP de la ruta de la glucolisis o del ciclo del TCA (*véanse* Reacción Gly-6 de la Figura 9.7 y la reacción TCA-4 de la Figura 10.8).

Pero mientras que otros continuaban su febril búsqueda de intermediarios de alta energía, el bioquímico británico Peter Mitchell planteó la revolucionaria idea de que esos intermediarios pudiesen no existir. En 1961, Mitchell propuso una explicación alternativa, que llamó el **modelo de acoplamiento quimiosmótico**. Según este modelo, la trasferencia exergónica de electrones por medio de los complejos respiratorios estaba acompañada por el bombeo unidireccional de protones a través la membrana en la que se localizaba el sistema de transporte. El gradiente electroquímico de protones que se genera y se mantiene de esta forma proporciona la fuerza impulsora de la síntesis de ATP. En otras palabras, el «eslabón perdido» entre el transporte de electrones y la síntesis de ATP no era un intermediario de alta energía sino un gradiente electroquímico de protones. Este mecanismo se ilustra en la Figura 10.15, que muestra, tanto el bombeo hacia fuera de protones que acompaña al transporte de electrones entre los complejos I, III y IV, como la síntesis de ATP, promovida por los protones gracias al complejo F_oF_1.

Como podrá suponer, la teoría de Mitchell se encontró con una resistencia inicial y un escepticismo considerables. No sólo se trataba de una postura radical que nada tenía que ver con el conocimiento convencional acerca del acoplamiento, sino que además Mitchell la propuso sin ningún dato experimental. Sin embargo, con el paso de los años, se han ido acumulando una gran cantidad de pruebas que la apoyan, y en 1978 Mitchell fue galardonado con el premio Nobel por su

trabajo pionero. Hoy en día, el modelo de acoplamiento quimiostático es un concepto bien verificado que proporciona un contexto unificador del conocimiento de las transformaciones energéticas no sólo en las membranas mitocondriales, sino también en los cloroplastos y en las bacterias.

El aspecto principal del modelo quimiosmótico es que *el nexo entre el transporte de electrones y la producción de ATP es un potencial electroquímico a ambos lados de una membrana*. Es este aspecto, de hecho, el que da al modelo su nombre: la parte de «quimio» hace referencia a los procesos químicos de oxidación y a la transferencia de electrones y la parte «osmótica» proviene de la palabra griega *osmos*, que significa «empujar» —empujar los protones a través de una membrana, en este caso—. El modelo quimiosmótico ha resultado ser excepcionalmente útil no sólo porque explica de forma muy plausible la producción de ATP acoplada, sino también por la influencia dominante que tiene en la manera en que entendemos la conservación de energía en los sistemas biológicos.

La oxidación de las coenzimas bombea los protones suficientes para generar 3 ATP por cada NADH y 2 ATP por cada $FADH_2$

Antes de considerar las pruebas experimentales que han confirmado el modelo quimiosmótico, observe que la Figura 10.15 nos proporciona una estimación de los protones bombeados hacia fuera por los tres complejos respiratorios que participan en la oxidación del NADH, al igual que del número de protones que se requiere para impulsar la síntesis de ATP por el complejo F_oF_1. La palabra «estimación» aquí es importante porque los investigadores todavía no se ponen de acuerdo en estos números.

Como ya hemos visto, la mayoría de las deshidrogenasas de la matriz mitocondrial transfieren los electrones desde sustratos oxidables al NAD^+, produciéndose NADH. El NADH, a su vez, transfiere los electrones al componente FMN del complejo I, y por tanto, se inicia el sistema de transporte de electrones. Como muestra la Figura 10.15, la transferencia de dos electrones del NADH al oxígeno, a través de la cadena respiratoria viene acompañada por el bombeo transmembrana de 4 protones por el complejo I, 4 protones por la CoQ más el complejo III, y 2 protones por el complejo IV, que suman un total de 10 protones por cada NADH.

Se piensa que el número de protones requeridos para promover la síntesis de una molécula de ATP por la ATP sintasa F_oF_1 , es de 3 ó 4, teniéndose al número de 3 como el más probable. Si asumimos que se bombean 10 protones por cada molécula de NADH oxidada y que se necesitan 3 protones por cada molécula de ATP, podremos entonces concluir que la fosforilación oxidativa tiene un rendimiento de 3 moléculas de ATP por cada molécula de NADH oxidada. Esto encaja bien con las evidencias existentes desde 1940 de que generalmente existe una relación fija entre el número de moléculas de ATP generadas y el número de átomos de oxígeno consumidos en la respiración, según se pasan un par de electrones a lo largo de la secuencia de transportadores desde las coenzimas reducidas al oxígeno. Racker y sus colaboradores, por ejemplo, mostraron en vesículas sintéticas de fosfolípidos que contenían los complejos I, III o el complejo IV que se podía generar una molécula de ATP por cada par de electrones que pasan a través del complejo. Estos resultados están de acuerdo con nuestro conocimiento actual de que cada uno de estos tres complejos funcionan como una bomba de protones, contribuyendo de esta manera al gradiente de protones que promueve la síntesis de ATP.

Para facilitar nuestro análisis, asumiremos que el rendimiento de ATP es 3 para el NADH y 2 para el $FADH_2$, aunque teniendo presente que dichos rendimientos no se conocen de una manera precisa. Estos números son razonables, teniendo en cuenta que el valor de $\Delta G°'$ para la oxidación del NADH por el oxígeno molecular es de -52 kcal/mol. Esto supone un cambio de energía libre suficiente para producir 3 ATP (cada uno de ellos requiere aproximadamente 10 kcal/mol), aun en el caso de que la eficacia sea sólo del 50%.

El modelo quimiosmótico ha sido comprobado por un conjunto impresionante de evidencias

Desde que se enunció por primera vez en 1961, el modelo quimiosmótico ha sido universalmente aceptado como el nexo entre el transporte de electrones y la síntesis de ATP. Para entender por qué, consideraremos primero algunas de las líneas de pruebas experimentales más importantes que apoyan este modelo. Durante el proceso, aprenderemos también algo más sobre el mecanismo de acoplamiento quimiosmótico.

1. El transporte de electrones provoca el bombeo de protones fuera de la matriz mitocondrial

Poco después de proponer el modelo quimiosmótico, Mitchell y su colaboradora Jennifer Moyle demostraron experimentalmente que el flujo de electrones a lo largo del ETS viene acompañado del movimiento de protones a través de la membrana mitocondrial interna. En primer lugar, colocaron mitocondrias en un medio en el que no podía tener lugar la transferencia de electrones porque no había oxígeno. La concentración de protones (es decir, el pH) del medio se iba midiendo conforme se estimulaba la transferencia de electrones añadiendo oxígeno. Bajo estas condiciones, el pH del medio descendía rápidamente ya fuese la fuente de electrones el NADH o el succinato (Figura 10.16). Ya que un descenso en el pH refleja un incremento en la concentración de protones, Mitchell y Moyle concluyeron que la transferencia de electrones en la membrana mitocondrial interna está acompañada de un **bombeo unidireccional de protones** desde la matriz mitocondrial al medio externo.

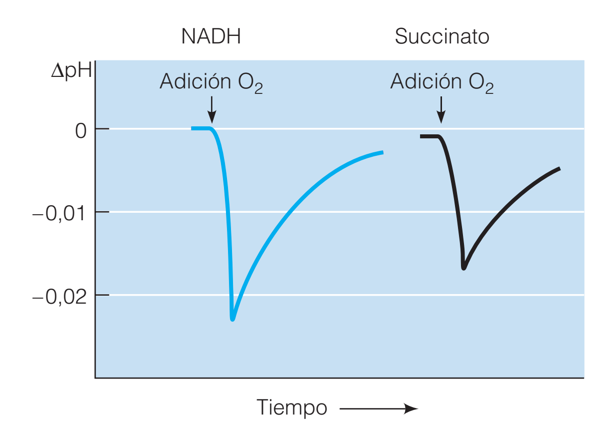


Figura 10.16 Prueba experimental de que el transporte de electrones genera un gradiente de protones. Se incubaron mitocondrias aisladas con NADH o succinato como fuente de electrones en un medio sin oxígeno. El pH del medio se iba midiendo conforme se estimulaba el transporte de oxígeno añadiendo una cantidad conocida de éste. El descenso rápido del pH refleja un incremento de la concentración de protones, lo que indica que se bombeaban hacia fuera de la matriz mitocondrial cuando había oxígeno disponible. El cambio de pH fue reproduciblemente mayor con el NADH que con el succinato, lo que concuerda con el mayor rendimiento que se obtiene con la oxidación del NADH.

El mecanismo por el cual se acopla la transferencia de electrones de un transportador a otro en el transporte direccional de protones, no se conoce muy bien todavía. De hecho, es posible que exista más de un mecanismo. Uno de los posibles es el comentado anteriormente de la coenzima Q, que transloca dos protones a través de la membrana mitocondrial a la vez que transporta dos electrones del complejo I al complejo III (Figura 10.15).

Los datos experimentales actuales sugieren que, en el caso del bombeo de protones por parte de los complejos I y IV, existe un segundo mecanismo de bombeo que puede consistir en cambios alostéricos de la conformación de las proteínas. En un estado conformacional, un polipéptido del complejo podría unir un protón en la superficie interna de la membrana. La transferencia de uno o más electrones a través del complejo, causaría un cambio conformacional del polipéptido, que liberaría el protón en la cara externa de la membrana. De esta manera, el bombeo de protones puede llevarse a cabo bien por el desplazamiento físico de una molécula transportadora como en el caso de la coenzima Q, o bien mediante un cambio conformacional en un polipéptido de un complejo respiratorio.

2. Los componentes del sistema de transporte de electrones están orientados asimétricamente dentro de la membrana mitocondrial interna

El bombeo unidireccional que demostraron Mitchell y Moyle exige que los transportadores de electrones que conforman la ETS estén dispuestos asimétricamente dentro de la membrana. Si no fuese así, los protones podrían, en teoría, bombear aleatoriamente en las dos direcciones. Se ha demostrado claramente, utilizando varios anticuerpos, enzimas y agentes marcadores diseñados para interaccionar con varios componentes de la membrana, que algunos constituyentes de los complejos respiratorios están orientados hacia la matriz mitocondrial, otros están expuestos en el lado contrario, y otros son proteínas transmembrana. Dichos descubrimientos confirman la suposición de que los componentes del ETS están distribuidos asimétricamente a lo largo de la membrana mitocondrial interna, en la manera que se muestra en la Figura 10.15.

3. Las vesículas que contienen los complejos I, III o IV, establecen gradientes de protones

Otra prueba en favor del modelo quimiosmótico proviene de los experimentos que consisten en la reconstrucción de vesículas a partir de la combinación de los componentes por separado. Dado que cada complejo respiratorio I, III y IV presenta un sitio de acoplamiento para la síntesis de ATP (*véase* Figura 10.15), el modelo quimiosmótico supone que cada uno de estos complejos debería ser capaz de bombear protones a través de la membrana mitocondrial interna. Esta suposición ha sido confirmada experimentalmente reconstruyendo vesículas de fosfolípidos artificiales que contienen los complejos I, III o IV. Cuando se les proporciona un estrato oxidable apropiado, cada uno de estos tres complejos es capaz de bombear protones a través de la membrana de la vesícula. Como se había apuntado anteriormente, estas vesículas son también capaces de sintetizar ATP.

4. La fosforilación oxidativa requiere un compartimiento rodeado por una membrana

Una predicción obvia del modelo quimiosmótico es que la fosforilación oxidativa sólo tiene lugar dentro de un compartimiento cerrado por una membrana mitocondrial intacta. De otra manera, no podría mantenerse el gradiente de protones que permite la síntesis de ATP. Esta suposición ha sido confirmada experimentalmente mediante la demostración de que la transferencia de electrones llevada a cabo por complejos aislados no puede acoplarse a la síntesis de ATP a no ser que estos complejos estén incorporados en membranas que formen una vesícula cerrada.

5. Las sustancias desacoplantes impiden tanto la síntesis de ATP como la generación de un gradiente de protones

Una prueba adicional que enfatiza el papel desempeñado por el gradiente de protones en la síntesis de ATP,

proviene de los estudios en los que se han usado sustancias como el dinitrofenol (DNP), que se sabe que desacopla la síntesis de ATP del transporte de electrones. Por ejemplo, Mitchell demostró en 1963 que las membranas se vuelven permeables a los protones en presencia de DNP. En otras palabras, el dinitrofenol inhibe tanto la síntesis de ATP como la capacidad de una membrana de mantener un gradiente de protones. Este descubrimiento encaja perfectamente con el concepto de que la síntesis de ATP está promovida por un gradiente electroquímico de protones.

6. El gradiente de protones tiene la suficiente energía para impulsar la síntesis de ATP

Para que el modelo quimiosmótico sea posible, el gradiente de protones generado por el transporte de electrones debe almacenar la suficiente energía para permitir la síntesis de ATP. Podemos abordar este punto con unos pocos cálculos termodinámicos. El gradiente electroquímico de protones a ambos lados de la membrana interna de una mitocondria metabólicamente activa, implica, tanto un potencial de membrana (el componente «electro» del gradiente), como un gradiente de concentración (el componente «químico»). Como podrá recordar del Capítulo 8, la ecuación que se utiliza para cuantificar este gradiente electroquímico tiene dos términos, uno para el potencial de membrana V_m, y el otro para el gradiente de concentraciones, que en el caso de los protones, es un gradiente de pH (*véase* Tabla 8.4).

Las mitocondrias que participan activamente en la respiración aerobia poseen normalmente un potencial de membrana de unos 0,16 V (el valor es positivo en el lado que da al espacio intermembrana) y un gradiente de pH de cerca de 1,0 unidades (mayor en el lado de la matriz). Este gradiente electroquímico ejerce una **fuerza protón-motriz (pmF)** que tiende a empujar a los protones de vuelta, según su gradiente de concentración —es decir, de vuelta a la matriz mitocondrial—. La pmf puede calcularse juntando las contribuciones del potencial de membrana y el gradiente de pH según la siguiente ecuación:

$$\text{pmf} = V_m + 2.303 \text{ RT } \Delta\text{pH}/F \qquad \textbf{(10.13)}$$

donde pmf es la fuerza protón-motriz en voltios, V_m es el potencial de membrana en voltios, ΔpH es la diferencia de pH a ambos lados de membrana ($\Delta\text{pH} = \text{pH}_{\text{matriz}} - \text{pH}_{\text{citosol}}$), R es la constante de los gases (1.987 cal/mol-°K), T es la temperatura en grados Kelvin, y F es la constante de Faraday (23,062 cal/mol).

Para una mitocondria con un V_m de 0,016V y un gradiente de pH de 1,0, el pmf se puede calcular de la manera siguiente:

$$\text{pmf} = 0{,}16 + \left(\frac{2.303(1.987)(37 + 273)(1{,}0)}{23{,}062}\right)$$
$$= 0{,}16 + 0{,}06 = 0{,}22 \text{ V} \qquad \textbf{(10.14)}$$

Observe que el potencial de membrana es responsable de más del 70% del pmf mitocondrial. En el siguiente capítulo veremos que la mayor parte del pmf del cloroplasto se debe, en cambio, a la diferencia excesiva de pH a ambos lados de la membrana.

Al igual que el potencial redox, el pmf es una fuerza eléctrica en voltios y puede utilizarse para calcular ΔG°′, el cambio de energía libre estándar para el movimiento de protones a través de la membrana, siguiendo la siguiente ecuación:

$$\Delta G^{\circ\prime} = -nF(\text{pmf}) = -(23.062)(0{,}22) = -5{,}1 \text{ kcal/mol} \qquad \textbf{(10.15)}$$

De esta manera, una fuerza protón-motriz de 0,22 V a través de la membrana mitocondrial interna corresponde a un cambio de energía libre de alrededor de −5,1 kcal por mol de protones. Ésta será la cantidad de energía que será liberada cuando los protones regresen a la matriz.

¿Es esto suficiente para impulsar la síntesis de ATP? No es sorprendente que la respuesta sea sí, aunque depende de cuántos protones se necesitan para impulsar la síntesis de una molécula de ATP por el complejo F_oF_1. El modelo original de Mitchell asume dos protones por ATP, lo que proporcionaría aproximadamente 10,2 kcal/mol, una cantidad muy justa para producir la síntesis de ATP, si consideramos que la ΔG′ para la fosforilación del ADP es de cerca de 10 kcal/mol, en las condiciones mitocondriales. Todavía existen diferentes opiniones acerca del número de protones por ATP, pero el número real probablemente se encuentre más cerca de tres o cuatro, lo que proporcionaría alrededor de 15-20 kcal de energía por ATP, una cantidad suficiente para asegurar que la reacción esté dirigida claramente en el sentido de la formación de esta molécula.

7. Gradientes de protones artificiales pueden impulsar la síntesis de ATP en ausencia de transporte de electrones

Una prueba directa de que un gradiente de de protones puede de hecho impulsar la síntesis de ATP se obtuvo exponiendo a las mitocondrias o a vesículas compuestas por la membrana interna a gradientes de pH artificiales. Cuando las mitocondrias se introducen en una solución en la que la concentración externa de protones se ve incrementada repentinamente por la adición de un ácido, se genera ATP en respuesta al gradiente de protones creado artificialmente. Dado que estos gradientes de pH artificiales inducen la formación de ATP incluso en ausencia de sustratos oxidables que, en otra circunstancia, cederían los electrones a la ETS, es evidente que la síntesis de ATP puede inducirse por un gradiente de protones aunque no exista transporte de electrones.

Síntesis de ATP: juntando las piezas

Ya estamos preparados para estudiar la cuarta y última fase de la respiración aerobia: la síntesis de ATP. Hemos visto cómo parte de la energía de un sustrato oxidable como la glucosa, se transfiere a coenzimas reducidas durante las reacciones de oxidación de la glucolisis y el ciclo del ácido tricarboxílico (fases 1 y 2 de la Figura 10.1b) y cómo se utiliza después para generar un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna (fase 3). Ahora podemos preguntarnos cómo se aprovecha la pmf de ese gradiente para la síntesis de ATP. Para ello, volvamos a los complejos F_1 que pueden verse a lo largo de la superficie interna de las crestas (*véase* Figura 10.6a) y preguntémonos cuáles son las evidencias de que estas esferas son capaces de sintetizar ATP.

Las partículas F1 tienen actividad ATP sintasa

La evidencia clave sobre el papel de las partículas F_1 proviene de los estudios que condujeron a Efraim Racker y a sus colaboradores a probar la hipótesis quimiosmótica de que una ATPasa presente en la membrana, puede acoplar el transporte reversible de protones a la síntesis de ATP. Empezando con la mitocondria intacta (Figura 10.17a) fueron capaces de perturbar a ésta, de forma que se producían pequeñas vesículas, llamadas *partículas submitocondriales* a partir de fragmentos de la membrana interna (Figura 10.17b). Estas partículas submitocondriales fueron capaces de llevar a cabo el transporte de electrones y la síntesis de ATP. Sometiendo a estas partículas a agitación mecánica o tratamiento con proteasas se pudieron desplazar las estructuras F_1 de las vesículas membranosas (Figura 10.17c).

Cuando se separaron por centrifugación las partículas F_1 y las vesículas, la fracción membranosa todavía podía

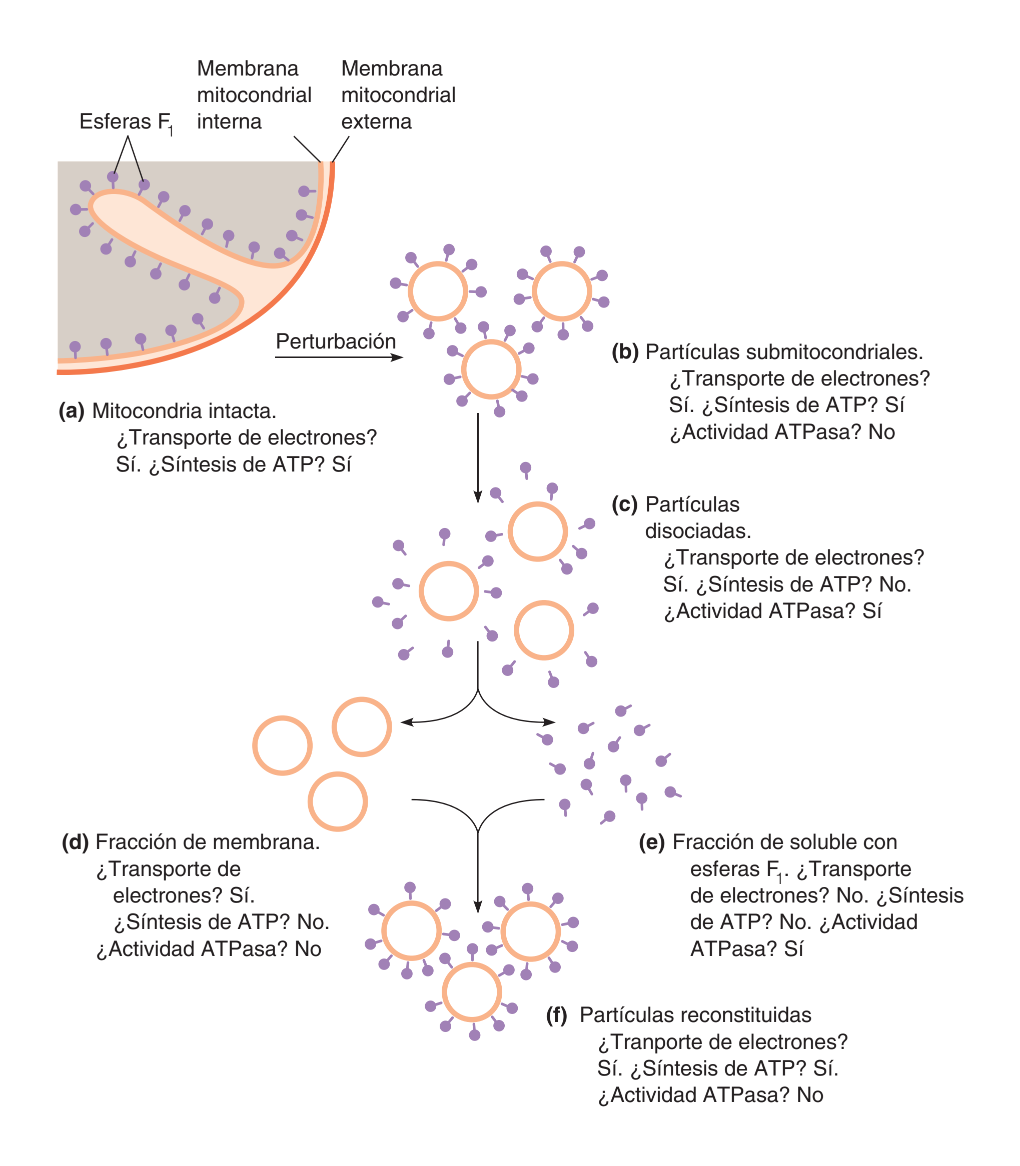


Figura 10.17 Disociación y reconstitución del sistema de síntesis de ATP mitocondrial. (**a**) Perturbación de la mitocondria intacta y formación de fragmentos de la membrana interna que dan lugar a (**b**) partículas submitocondriales capaces de transportar electrones y sintetizar ATP (**c**) Cuando estas partículas se disocian por agitación mecánica o tratamiento enzimático los componentes se pueden separar en (**d**) una fracción de membrana sin capacidad de síntesis de ATP y (**e**) una fracción soluble con esferas F_1 y actividad ATPasa. (**f**) Mezclando las dos fracciones se reconstituye la estructura y se recupera la actividad ATP sintasa.

llevar a cabo el transporte de electrones pero no podía seguir sintetizando ATP; las dos funciones se desacoplan (Figura 10.17d). Las partículas F_1 aisladas, por otra parte, no fueron capaces de transportar electrones y no tenían actividad ATPasa (Figura 10.17e), un hecho que concuerda con la actividad ATPasa de tipo F que ahora atribuimos al complejo F_oF_1 (*véase* Tabla 8.3). La capacidad de sintetizar ATP de la fracción membranosa, se recuperaba añadiendo de nuevo partículas F_1 a las membranas, lo que sugería que las proyecciones esféricas que veíamos en las superficie interna de la membrana mitocondrial interna eran una parte importante del complejo de membrana capaz de generar ATP. Estas partículas se denominaron, por lo tanto, *factores* (la «F» de F_1) *de acoplamiento* y ahora son conocidas por ser las estructuras responsables de la actividad de síntesis de ATP en la membrana mitocondrial interna y en la membrana plasmática bacteriana.

El complejo F_oF_1: el transporte de protones a través de F_o permite que F_1 sintetice ATP

Como vimos en la Figura 10.15, el complejo F_1 es sólo parte del complejo de la ATP sintasa. F_1 está unido al complejo F_o por medio de un pequeño complejo con forma de tallo. F_o está embebido en la membrana mitocondrial interna en la base del tallo (*véase* Figura 10.6c). Ahora sabemos que el complejo F_o funciona como **transportador de protones,** el canal que facilita el flujo de electrones manteniendo un gradiente electroquímico que permite la actividad de síntesis del ATP del complejo F_1. Así, el complejo F_0F_1 es la **ATP sintasa** funcional. El componente F_0 proporciona un canal para el flujo exergónico de protones desde fuera hacia dentro de la membrana, que dispara la pmf o fuerza motriz del gradiente electroquímico de protones. El componente F_1 lleva a cabo la síntesis de ATP gracias a la energía generada por este gradiente de protones.

La Tabla 10.4 presenta la composición polipeptídica del complejo F_oF_1 de *Escherichia coli*, y la Figura 10.18 ilustra su ensamblaje en el complejo funcional. (La mayor parte de lo que se conoce sobre estos complejos hace referencia a *E.coli*; se piensa que el complejo mitocondrial F_oF_1 es bastante parecido, aunque más complejo en cuanto a subunidades.) El complejo F_1 consta de tres polipéptidos α y tres β, organizados como tres complejos $\alpha\beta$ que forman un *hexágono catalítico*. El sitio catalítico de síntesis e hidrólisis del ATP se localiza en la subunidad β; la subunidad α sirve como sitio de unión ATP/ADP. El tallo consta de tres polipéptidos: gamma (γ), delta (δ) y épsilon (ϵ). Estas subunidades se prolongan hasta las estructuras F_1 y F_o, como indica la Figura 10.18. Las subunidades d y e son necesarias para el ensamblaje del complejo F_oF_1 y la subunidad γ parece rotar a medida que los electrones se mueven a través del canal en la estructura F_o. Este mecanismo fascinante se describirá mejor en la siguiente sección.

El complejo F_o consta de los polipéptidos *a, b* y *c* con 1 subunidad *a*, 2 subunidades *b* y de 9 a 12 subunidades *c* en cada complejo funcional. Se cree que las subunidades *c* se organizan en forma de círculo, generando un canal de protones a través de la membrana. Las subunidades *a* y *b* aparentemente estabilizan el canal de protones y la subunidad b se une al tallo, anclando la estructura F_1/tallo a la base de F_o.

La síntesis de ATP por F_oF_1 implica la rotación física de la subunidad gamma

Una vez que se estableció el nexo entre el transporte de electrones hacia dentro de la membrana y el bombeo de

Tabla 10.4 Composición polipeptídica de la F_oF_1-ATP sintasa de *E. coli*

Estructura	Polipéptido	Peso molecular**	Número de unidades presentes	Función
F_1	α	52.000	3	Sitio de unión ATP/ADP; promueve la actividad de la subunidad β
	β	55.000	3	Sitio catalítico para la hidrólisis y síntesis de ATP
Tallo	γ	31.000	1	Rota para transmitir energía de F_o a F_1
	δ	19.000	1	Componente fundamental del tallo; se requiere para el ensamblaje de F_oF_1
	ϵ	15.000	1	Se une a la subunidad δ; se requiere para el ensamblaje de F_oF_1
F_o	*a*	30.000	1	Estabiliza el canal de protones
	b	17.000	2	Estabiliza el canal de protones
	c	8.000	10***	Forma el canal de protones

*El complejo mitocondrial F_oF_1 es similar al complejo bacteriano pero con un polipéptido adicional en F_1 y siete polipéptidos adicionales en F_o.

**El peso molecular de los tres componentes en *E.coli* es, aproximadamente, 321000 para F_1 ($\alpha_3\beta_3$), 65000 para el tallo ($\gamma\delta\epsilon$) y 144000 para $F_o(ab_2c_{10})$. El peso molecular total para el complejo ensamblado ($\alpha_3\alpha_3\gamma\delta\epsilon ab_2c_{10}$) es aproximadamente 530000.

*** Estimación del número de subunidades c en el complejo funcional F_oF_1 de *E.coli*, en un rango entre 9 y 12, en el que se considera el 10 como número más probable.

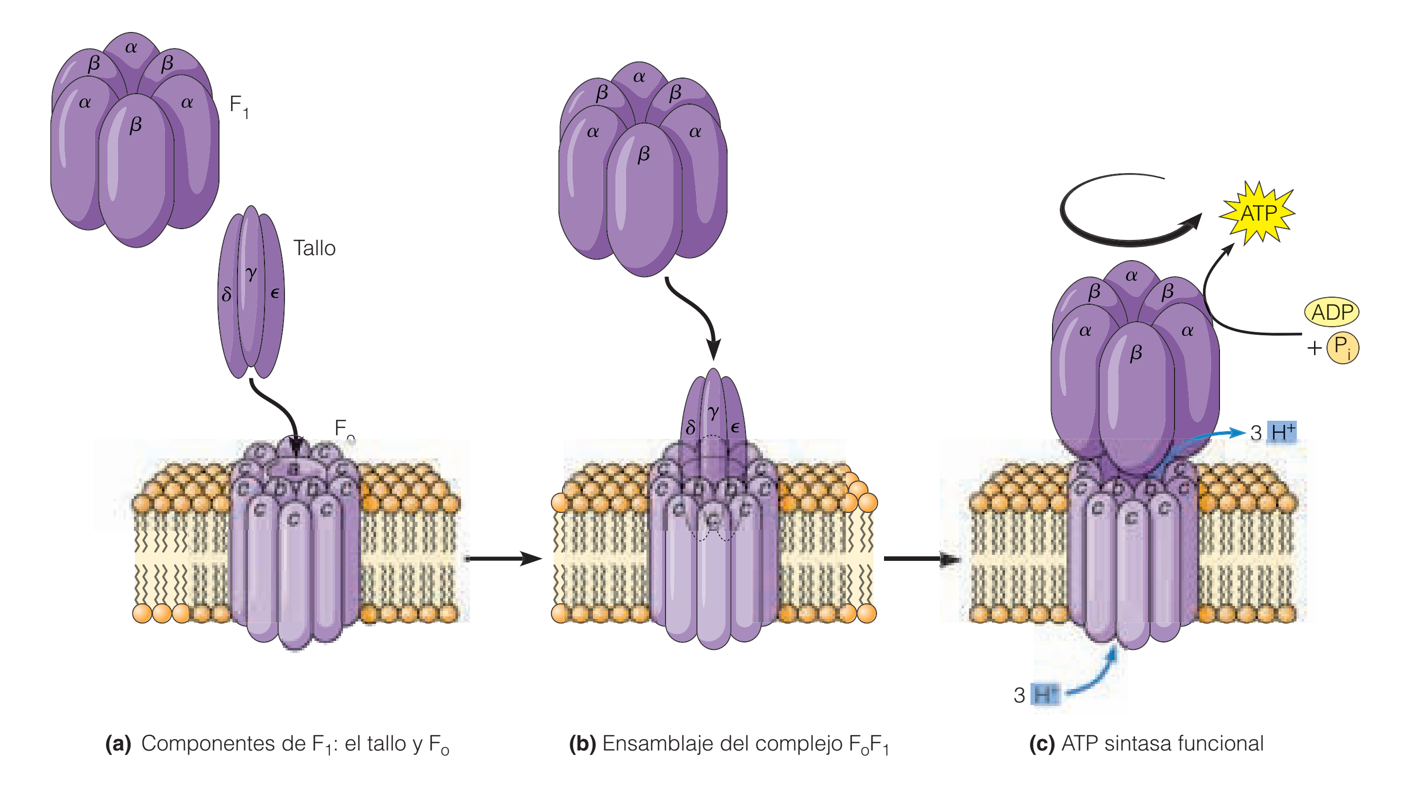


Figura 10.18 Los componentes F_1 y F_o de la F_oF_1 sintasa bacteriana. El complejo F_1 es una proyección esférica de la superficie interna de la membrana plasmática de una célula procariota o de la membrana mitocondrial interna de una célula eucariota y es el responsable de la generación de ATP. El complejo F_o está embebido en la membrana y proporciona un canal para el transporte exergónico de protones desde el exterior hacia el interior. (**a**) En una célula bacteriana la partícula F_1 es un complejo de 3 unidades α y 3 β que se organizan como un hexágono catalítico. El complejo F_o consta de una subunidad *a*, 2 subunidades *b* y entre 9 y 12 subunidades *c*, estas últimas ensambladas circularmente para formar un canal cilíndrico a través de la membrana. (**b**) F_1 y F_o están unidas a través de un tallo que consta de subunidades γ, δ y ϵ que se extienden hacia los complejos F_1 y F_o. (**c**) El complejo F_oF_1 ensamblado es capaz de usar la energía del flujo de protones a través del complejo F_o permitiendo a las subunidades β de la partícula F1 sintetizar el ATP. El mecanismo que acopla el transporte de electrones con la síntesis de ATP implica la rotación de la subunidad γ, como se representa en la Figura 10.19.

protones a través de la membrana, la siguiente pieza del puzle debió de ser desalentadora: ¿Cómo puede el flujo exergónico de protones a través del componente F_o de la ATP sintasa permitir la síntesis de ATP —de otro modo endergónica— por medio de los sitios catalíticos de las tres subunidades β del complejo F_1? En 1979 Paul Boyer sugirió una nueva respuesta para esta cuestión, proponiendo el **modelo de cambio por unión** mostrado en la Figura 10.19. El modelo de Boyer propone que el sitio catalítico de cada una de las tres subunidades del complejo F_1 puede encontrarse en tres conformaciones diferentes, con distintas afinidades por los sustratos (ADP y P_i) y el producto (ATP). Boyer las definió como: conformación L (de la palabra inglesa *loose*, que significa relajada), que une débilmente a ADP y P_i, conformación T (por la palabra inglesa *tight*, que significa tensa), que se une fuertemente a ADP y P_i , catalizando así su condensación espontánea a ATP, al cual se une también con alta afinidad. La conformación O (del inglés, *open*, abierto), presenta una afinidad muy baja tanto por los sustratos como por los productos y se encuentra, por tanto, desocupada la mayor parte del tiempo. Boyer propuso que, en cualquier momento, cada uno de los tres sitios activos está en una conformación diferente y que el anillo hexagonal de las subunidades α y α *rota* respecto al tallo central, gracias al flujo exergónico de protones a través del complejo F_o de la membrana.

Aunque en principio no se aceptó mayoritariamente, el modelo de Boyer fue esencialmente confirmado en 1994 por John Walker y sus colaboradores, que mediante cristalografía de rayos X desarrollaron el primer modelo atómico detallado del complejo F_1. Este modelo identificó concretamente estructuras en los sitios activos de las subunidades β que correspondían a las conformaciones O, L y T de Boyer y confirmaron que cada uno de estos tres sitios activos se encontraba en una confirmación distinta en cada momento. Es más, se vio que la subunidad γ del tallo que conecta los complejos F_1 y F_o (*véase* Figura 10.18) se extendía hacia el centro de la estructura F_1 de forma asimétrica de forma que su interacción y su efecto sobre las subunidades β es diferente en cada momento.

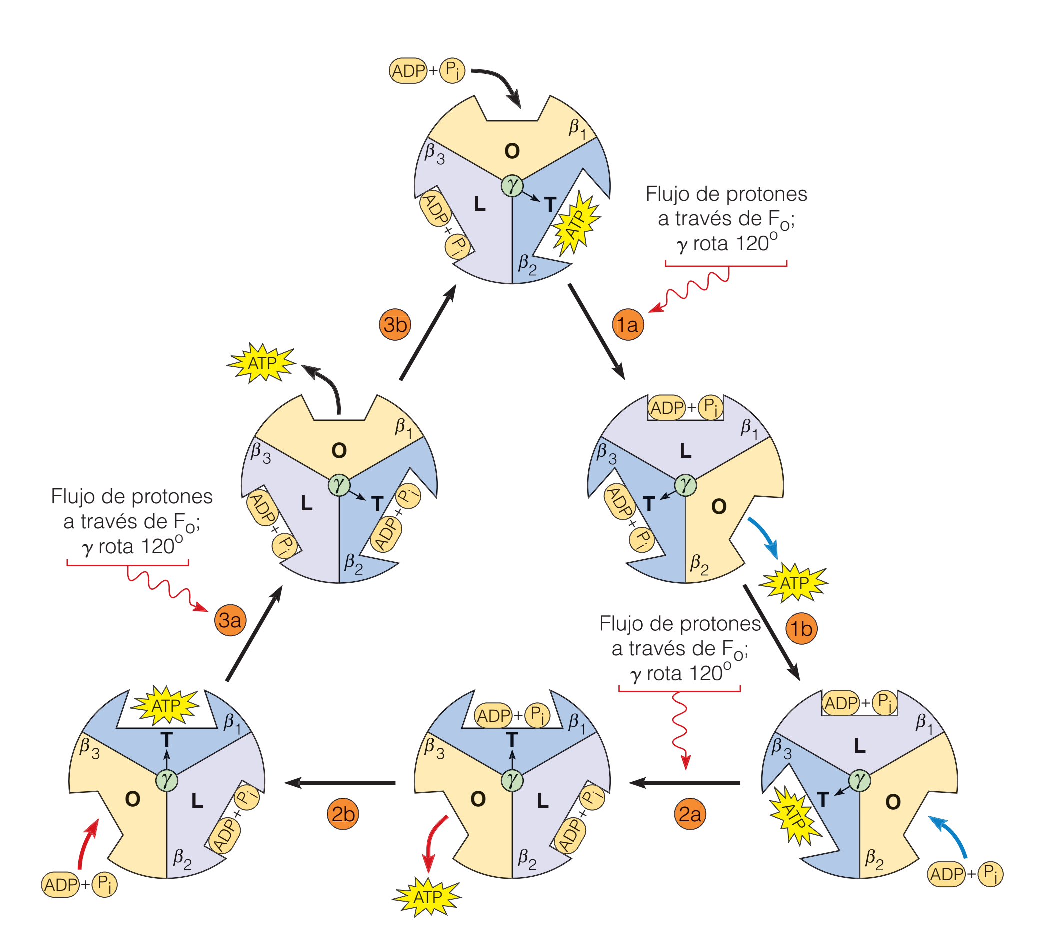


Figura 10.19. El modelo de cambio por unión para la síntesis de ATP por las unidades β del complejo F_oF_1. De acuerdo con este modelo, cada una de las subunidades β del complejo F_1 se encuentra una conformación distinta en cada momento y cada una experimenta una secuencia de cambios desde la conformación O (abierta) a la conformación T (tensa), pasando por la conformación L (relajada), dirigiendo la rotación de la subunidad γ, cuya asimetría afecta de distinta manera a cada subunidad β en los distintos puntos de rotación. (La subunidad ϵ del tallo también rota-así como, probablemente, el anillo de subunidades β del complejo F_o, aunque aquí sólo se representan las subunidades γ.) Como se muestra en la subunidad de la parte superior del diagrama (que se identifica arbitrariamente como β_1; las tres subunidades son, de hecho, idénticas en secuencia amino y estructura), el proceso de síntesis de ATP empieza con la subunidad β_1 en su conformación O e implica (1a) una rotación de 120° de la subunidad γ (indicada esquemáticamente por el cambio de orientación de la flecha proyectada hacia fuera de la subunidad γ del centro), que a la subunidad β_1 a su conformación L y causa, por tanto, la relajación de la unión a ADP y P_i; (1b) generación de ATP por una de las otras subunidades (β_3); (2a) una segunda rotación de 120° de la subunidad γ, que induce un cambio a la conformación T, que hace que los sustratos se unan fuertemente al sitio catalítico, tiene como resultado, en (2b) la condensación de estos sustratos para dar lugar a la molécula de ATP; (3a) una tercera rotación de 120° de la subunidad γ, que devuelve a la subunidad β_1 a la conformación O y produce una liberación de la nueva molécula de ATP generada; seguida de la (3b) generación de ATP por el sitio β_2, completando un ciclo de catálisis. Observe que en los demás sitios, se ha dado la misma secuencia de acontecimientos, pero se encuentra inactiva temporalmente, ya que se libera sólo 1 molécula de ATP después de cada rotación de 120° de la subunidad γ, con un total de 3 moléculas de ATP por cada vuelta completa.

El modelo de cambio por unión en acción. La secuencia de acontecimientos que se muestra en la Figura 10.19 es un modelo real de cómo el flujo exergónico de protones a través del complejo F_o permite la síntesis de ATP en los sitios catalíticos de las tres subunidades β del complejo F_1. El flujo de protones a través de un canal de la subunidad *a* de F_o dirige la rotación del anillo de las subunidades *c* en la estructura F_o, y por tanto, también la rotación de la subunidad g del tallo, que se encuentra anclado al anillo de las subunidades *c*. La asimetría de la subunidad γ no sólo supone interacciones particularmente distintas con las tres subunidades b en un momento dado sino que provoca que cada subunidad β pase sucesivamente a través de las conformaciones O, L y T a medida que la subunidad β rota 360 grados.

La subunidad β_1 empieza con la conformación O, en la que los sustratos ADP y P_i pueden entrar libremente al sitio catalítico (*véase* Figura 10.19). El sitio catalítico tiene poca afinidad por ellos en esta conformación. A medida que los protones fluyen a través de la subunidad F_o de la membrana, el anillo formado por la subunidad c y la subunidad g anclada a él, rotan 120° grados (paso 1a). Esto

induce un cambio en el sitio β_1, que pasa de la conformación O a la L (y produce, asimismo, un cambio en la conformación de otras dos subunidades β). La conformación L tiene una afinidad algo mayor por ADP y P_i, lo que permite la unión de estos sustratos al sitio activo.

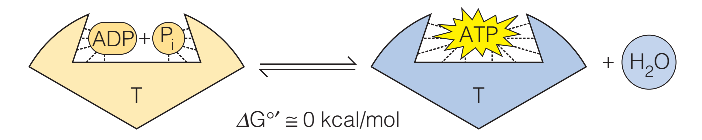
Después de la producción de una molécula de ATP por la subunidad β_2 (paso 1b), la subunidad g rota otros 120°, dirigida de nuevo por el flujo de protones a través del canal F_o (paso 2a). Esto induce un cambio en la subunidad β_1, que pasa a la conformación T, que incrementa la afinidad del sitio activo por las moléculas de sustrato. Ahora están fuertemente unidas al sitio catalítico en una orientación que facilita al máximo la interacción. En estas condiciones las moléculas de ADP y Pi se condensan espontáneamente para formar ATP (paso 2b). La subunidad g rota ahora otros 120°, devolviendo a β_1 a la conformación O y liberando, por tanto, el ATP del sitio catalítico (paso 3a). Tras la producción de ATP por una de las otras subunidades (la subunidad β_2; paso 3b), se completa un ciclo y la subunidad β_1 está disponible para otra ronda de síntesis de ATP. Observe que esta misma secuencia de reacciones se ha dado también en las otras dos subunidades. Así, cada vuelta completa de la subunidad γ implica tres rotaciones de 120° que requieren energía. Esto tiene como resultado la síntesis de 3 moléculas de ATP, una por cada subunidad β.

¿Síntesis espontánea de ATP? Un análisis detallado de la Figura 10.19 revela que cada uno de los pasos en los que se sintetiza ATP a partir de ADP y P_i (es decir, los pasos 1b, 2b y 3b) no requieren energía. Ya sabemos que la síntesis de ATP es una reacción altamente endergónica. Entonces, podríamos preguntarnos, ¿cómo puede darse la síntesis de ATP espontáneamente en el sitio catalítico de la subunidad β en su conformación T? De hecho, lo que sabemos realmente es que la síntesis de ATP es una reacción altamente endergónica *en una solución acuosa diluida*, que es el único contexto en que hemos visto la síntesis de ATP hasta ahora. Sin embargo, la reacción *en el sitio catalítico de la subunidad* β implica intermediarios que se unen a la enzima en un ambiente drásticamente distinto-tan distinto, de hecho, que la reacción en estas condiciones tiene una $\Delta G°'$ cercana a cero (Figura 10.20b) y puede, por tanto, darse espontáneamente, sin ningún requerimiento energético inmediato.

Esto no significa que la síntesis de ATP tenga lugar, sin embargo, sin un coste termodinámico; esto significa simplemente que se requiere energía en otro punto del ciclo. De hecho, se requiere energía, tanto antes de la formación de ATP, como después: se necesita un aporte de energía previo para permitir la transición del sitio catalítico de la conformación L a la conformación T, empaquetando estrechamente ADP y P_i y facilitando su interacción (como en el paso 2a de la Figura 10.19). La liberación del ATP producido, unido con alta afinidad al sitio catalítico, requiere un aporte energético posterior (como en el paso 3a).

$$ADP + P_i + H^+ \longrightarrow ATP + H_2O$$
$$\Delta G°' = +7{,}3 \text{ kcal/mol}$$

(a) Síntesis de ATP en solución acuosa diluida



(b) Síntesis de ATP a partir de ADP y P_i unidos a proteína

Figura 10.20 Comparativa energética de la síntesis de ATP. El requerimiento energético para la síntesis de ATP es muy distinto dependiendo del ambiente. (**a**) En una solución acuosa diluida, la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i soluble es altamente endergónica, con una $\Delta G°'$ de +7,3 kcal/mol. (**b**) En el sitio catalítico de la subunidad b en su conformación T, sin embargo, el ambiente es drásticamente distinto y la reacción tiene una $\Delta G°'$ cercana a 0 (es decir, la K_{eq} es cercana a 1) y por tanto, puede darse espontáneamente sin ningún requerimiento inmediato de energía.

El modelo quimiosmótico implica un tráfico de protones dinámico a través de la membrana

En la Figura 10.21 se resume la dinámica del modelo quimiosmótico. Los complejos I, III y IV del ETS bombean protones hacia fuera de la membrana mitocondrial interna y el gradiente electromecánico resultante promueve la generación de ATP por medio de los complejos F_oF_1 asociados a la misma membrana. Hay, en otras palabras, un tráfico dinámico y continuo de protones a través de la membrana interna (o la membrana plasmática, en el caso de los procariotas). Suponiendo que el número de protones expulsados por cada uno de los complejos respiratorios, es como se muestra, y que se requieren 3 protones para la síntesis de 1 molécula de ATP, entonces tiene sentido que la producción sea de 3 ATP por NADH y 2 ATP por $FADH_2$.

La respiración aerobia: resumen global

Para resumir la respiración aerobia, volvamos a la Figura 10.1 de nuevo y recordemos el papel de cada uno de sus componentes. A medida que los sustratos como los carbohidratos y las grasas se van oxidando para generar energía, se van reduciendo coenzimas. Estas coenzimas reducidas representan una forma de almacenamiento de la energía libre liberada por las moléculas de sustrato originales durante la oxidación. Esta energía puede utilizarse para la síntesis de ATP mientras las coenzimas son reoxidadas por el ETS. A medida que los electrones se transportan del

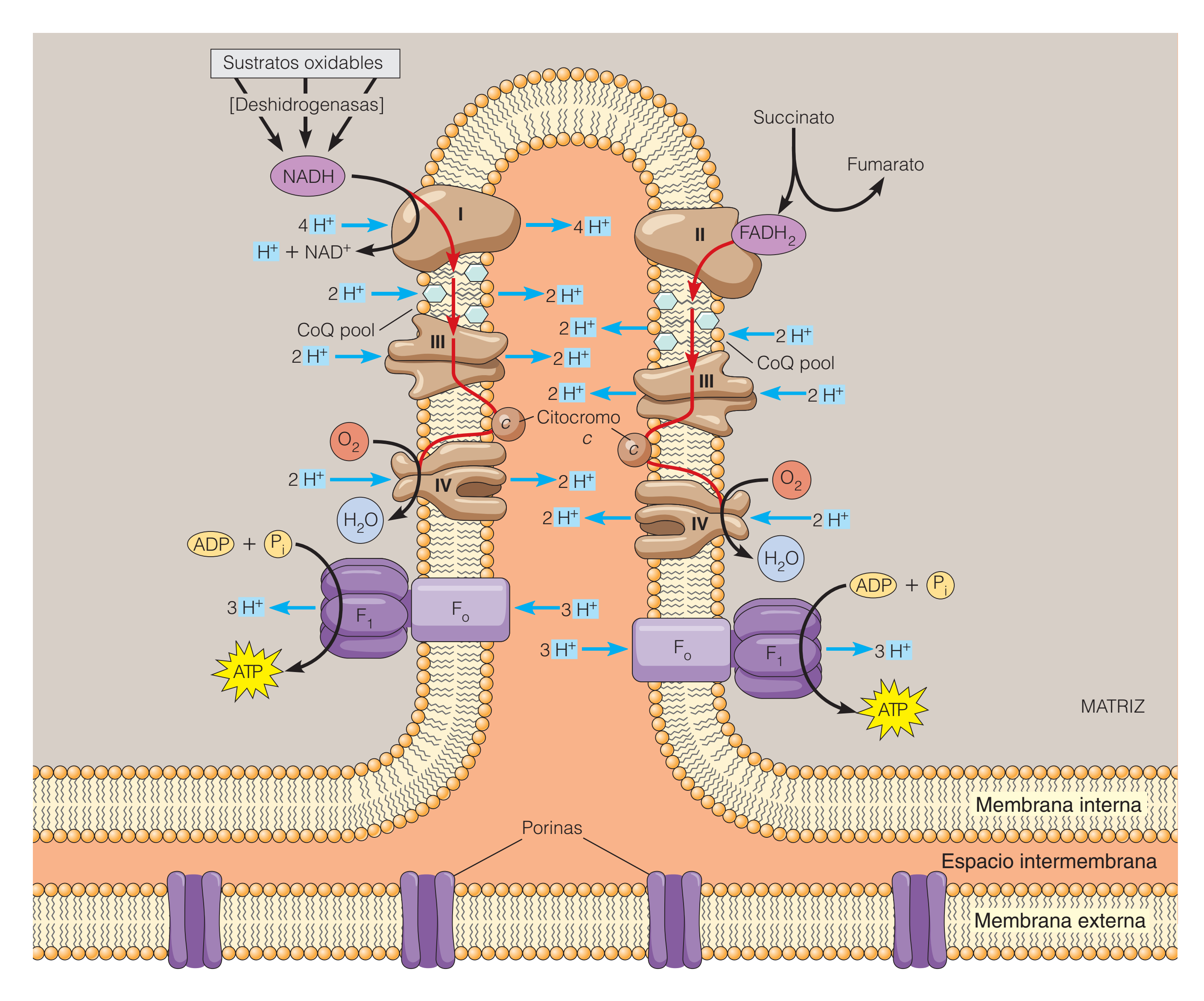


Figura 10.21 **Dinámica del gradiente electroquímico de protones.** Los complejos respiratorios I, II, III y IV son componentes integrales de la membrana mitocondrial interna. Los complejos I, III y IV (pero no el complejo II) acoplan el flujo exergónico de electrones (líneas rosas) a través del complejo con el bombeo de protones hacia fuera de la membrana (azul). La fuerza motriz resultante del gradiente electroquímico de protones permite la síntesis de ATP por F_1 a medida que los protones atraviesan de vuelta la membrana por el complejo F_o, que está también anclado a la membrana interna. Observe que la síntesis de ATP consume protones en la matriz mitocondrial, una carencia que contribuye al gradiente de protones en la membrana, responsable de la síntesis de ATP.

NADH o $FADH_2$ al oxígeno, van pasando a través de varios complejos respiratorios, donde el transporte de electrones se acopla al bombeo direccional de protones, a través de la membrana. *El gradiente electroquímico resultante ejerce unA pmf que sirve como fuerza motriz para la síntesis de ATP.* En la mayoría de las condiciones se puede mantener una pmf estable a través de la membrana. La transferencia de electrones desde las coenzimas al oxígeno se ajusta cuidadosa y continuamente, de manera que el bombeo de electrones hacia fuera equilibra el flujo de entrada de protones necesario para que la síntesis de ATP se dé a la velocidad adecuada.

El máximo rendimiento de ATP en la respiración aerobia es de 36-38 ATPs por molécula de glucosa

Ahora podemos volver a la cuestión de cuál es el **máximo rendimiento de ATP** por molécula de glucosa en condiciones aeróbicas. Recordemos de la Reacción 10.3 que la oxidación completa de la glucosa a dióxido de carbono por la glucolisis y el ciclo del TCA tiene como resultado la producción de 4 moléculas de ATP por fosforilación desde sustratos. La mayor parte de la energía libre restante de la oxidación de la glucosa se almacena en las 12 moléculas de coenzima —10 de NADH y 2 de $FADH_2$—. En los proca-

riotas y en algunas células eucariotas, los electrones de todas las moléculas de NADH pasan a través de los tres complejos responsables de la síntesis de ATP del ETS, dando lugar a 3 moléculas de ATP por molécula de coenzima. Los electrones del $FADH_2$, por otra parte, atraviesan sólo 2 de los complejos, dando lugar a, tan sólo, 2 moléculas de ATP por molécula de coenzima. El máximo rendimiento teórico de ATP obtenido por la reoxidación de las 12 moléculas de coenzima formadas a partir de cada glucosa, se puede representar de la siguiente manera:

$$10NADH + 10H^+ + 5O_2 + 30ADP + 30P_i \rightarrow 10NAD^+ + 10H_2O + 30ATP \qquad \textbf{(10.16)}$$

$$2FADH_2 + O_2 + 4ADP + 4P_i \rightarrow 2FAD + 2H_2O + 4ATP \qquad \textbf{(10.17)}$$

Sumando estas reacciones, obtenemos la reacción global del transporte electrónico y de la síntesis de ATP:

$$10NADH + 10H^+ + 2FADH_2 + 6O_2 + 34ADP + 34P_i \rightarrow 10NAD^+ + 2FAD + 12H_2O + 34ATP \qquad \textbf{(10.18)}$$

La suma de la reacción 10.18 a la reacción global de la glucolisis y el ciclo del TCA (Reacción 10.3) lleva a la siguiente expresión general para el rendimiento máximo teórico de ATP, obtenido por la respiración completa de la glucosa y otras hexosas:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \xrightarrow{38ADP+38P_i \;\rightarrow\; 38ATP} 6CO_2 + 6H_2O \qquad \textbf{(10.19)}$$

Esta reacción general es válida para la mayoría de las células procariotas y para algunos tipos de células eucariotas. Dependiendo del tipo celular, sin embargo, el máximo rendimiento de ATP para una célula eucariota puede ser de 36 en lugar de 38 debido al menor rendimiento de moléculas de NADH generadas en el citosol respecto a la mitocondria (véase la primera de las preguntas, planteadas más abajo).

Antes de abandonar la Reacción 10.19 y el metabolismo aeróbico que esta reacción resume, consideraremos dos cuestiones bastante frecuentes que le ayudarán a entender la respiración aerobia.

1. ¿Por qué el rendimiento máximo de ATP en las células eucariotas varía entre 36 y 38 ATPs por cada glucosa? Recuerde que cuando la glucosa se cataboliza aeróbicamente en una célula eucariota, la glucolisis genera, en el citosol, 2 moléculas de NADH por cada glucosa, mientras que el catabolismo del piruvato genera otras ocho moléculas de NADH en la matriz mitocondrial. Esta distinción espacial es importante porque la membrana interna de la mitocondria no tiene una proteína transportadora para el NADH o el NAD^+, de forma que el NADH generado en el citosol no puede entrar en la mitocondria para liberar sus electrones al complejo I del ETS. En lugar de eso, los electrones e iones H^+ pasan hacia el interior mediante uno de los distintos *sistemas de transporte de electrones* que difieren en el número de moléculas de ATP formadas por molécula de NADH oxidada.

Un **sistema de transporte de electrones** consta de uno o más transportadores de electrones que pueden ser reducidos reversiblemente. Estas proteínas transportadoras se pueden encontrar en la membrana tanto en la forma reducida como oxidada. Para que pueda producirse el movimiento de los electrones hacia la mitocondria, el NADH del citosol pasa sus electrones y protones a una molécula transportadora del citosol y se oxida a NAD^+, que se puede usar de nuevo como aceptor de electrones en la glucolisis o en otros procesos citosólicos. Mientras tanto, la forma reducida del transportador entra en la mitocondria, donde es oxidada por una enzima mitocondrial, dando lugar a NADH o $FADH_2$. La diferencia en el rendimiento de ATP entre las células eucariotas estriba en el modo de oxidación de la molécula transportadora dentro de la mitocondria, que puede implicar la transferencia de electrones a NAD^+ o FAD, dependiendo del tipo celular (2ATP/glucosa menos por transferencia al FAD mitocondrial).

En las células del hígado, el riñón y el corazón, los electrones del NADH citosólico se transfieren a la mitocondria por medio del *sistema de transporte malato-aspartato*, un complejo mecanismo que da lugar a NADH a partir de NAD^+ en la matriz. Los electrones derivados del NADH citosólico pasan así a través de tres complejos de bombeo de protones del sistema de transporte y son, por lo tanto, capaces de generar tres moléculas de ATP por cada molécula de coenzima.

Por otro lado, en el músculo esquelético, en el cerebro y en otros tejidos, el NADH citosólico libera electrones hacia los complejos mitocondriales respiratorios por medio de un mecanismo de transporte que usa FAD en lugar de NAD^+ como aceptor de electrones mitocondrial. En la Figura 10.22 se representa este mecanismo, denominado **lanzadera del glicerol fosfato**. En la lanzadera del glicerol fosfato participan las isoformas citosólica y mitocondrial de la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), que oxida reversiblemente al glicerol-3-fosfato (glicerol-3-P) a dihidroxiacetona fosfato (DHAP). La forma citosólica de la enzima transfiere electrones del NADH al DHAP, reduciéndolo a glicerol-3-P.

El glicerol 3-P pasa luego a la mitocondria, donde se reoxida a DHAP mediante una G3PDH dependiente de FAD localizada en la cara externa de la membrana interna. Dado que esta enzima unida a la membrana utiliza FAD en lugar de NAD^+ como aceptor de electrones, éstos se transfieren directamente a la coenzima Q. En consecuencia los electrones no pasan por el primer lugar de conservación de energía del ETS, generándose sólo dos moléculas de ATP en lugar de tres y reduciéndose el rendimiento máximo teórico en una molécula de ATP por NADH citosólico y por tanto, en dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa (de 38 a 36).

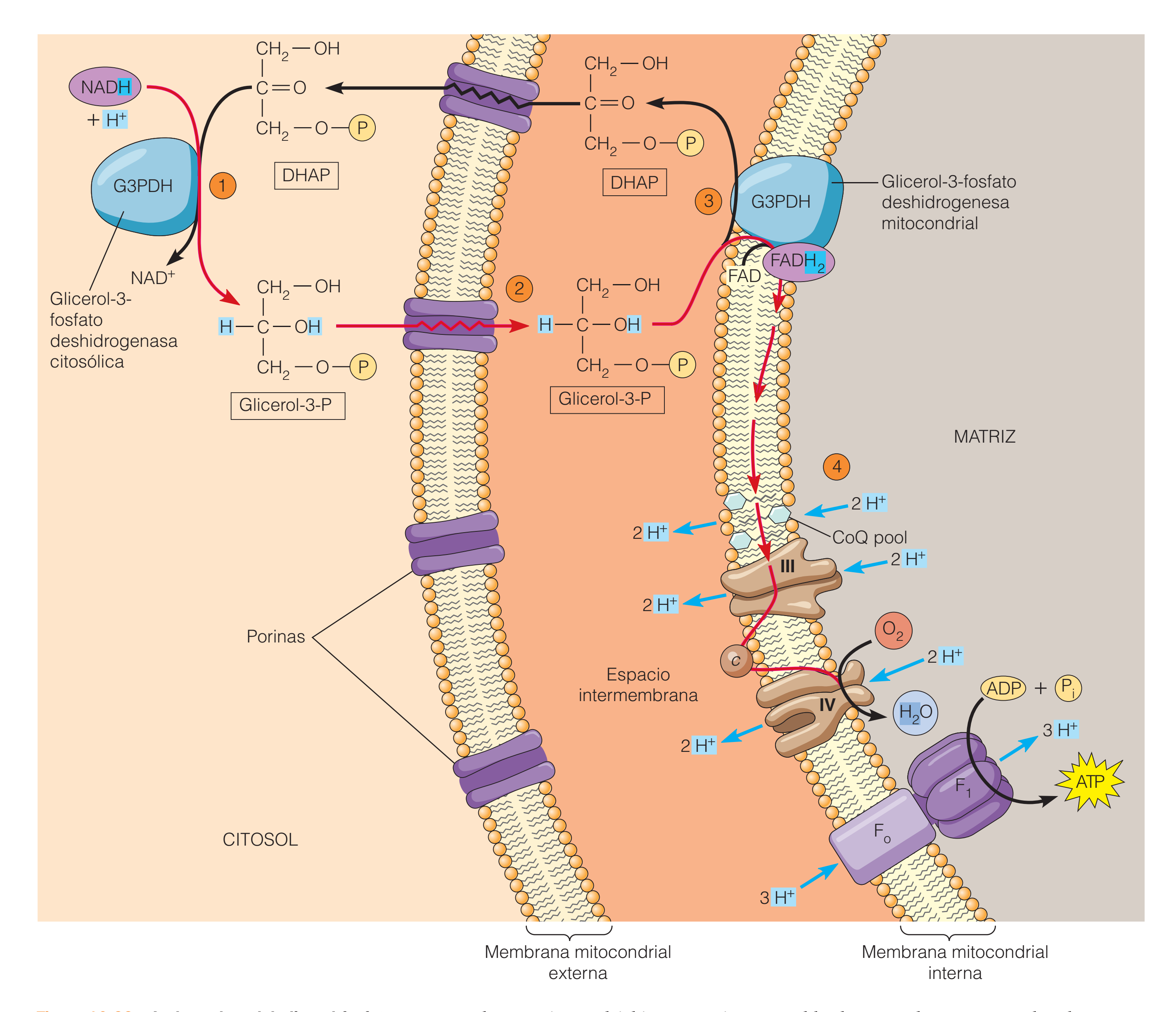


Figura 10.22 La lanzadera del glicerol fosfato. La membrana mitocondrial interna es impermeable al NADH de manera que los electrones del NADH entran a la mitocondria mediante dos tipos de sistemas de transporte. Las células del músculo esquelético, cerebro y otros tejidos usan el sistema de transporte del glicerol fosfato. Las líneas rosas indican la ruta de los electrones desde el NADH citosólico hasta el oxígeno. (1) La enzima citosólica glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) usa electrones (y protones) del NADH para reducir dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a glicerol-3-fosfato (glicerol-3-P) que (2) puede atravesar la membrana mitocondrial externa difundiendo a través de un canal de porinas. (3) El glicerol-3-P es oxidado después a DHAP por una FAD-G3PDH de la membrana interna, con la reducción concomitante de FAD a $FADH_2$. Dado que la NADH es una coenzima de mayor energía que el $FADH_2$, el transporte de entrada de electrones, facilitado por la diferencia de potenciales de reducción de las dos coenzimas, es exergónico. El coste de esta entrada de electrones es un menor rendimiento de ATP porque (4) los electrones del $FADH_2$ generado por la G3PDH mitocondrial, no pasan por el complejo I, de manera que se reduce el número de protones bombeados a través de la membrana interna.

2. ¿Por qué se considera el rendimiento de ATP en la respiración aerobia como «el máximo rendimiento teórico»? Esta expresión es una forma de recordar que el rendimiento de 36 a 38 moléculas de ATP por molécula de glucosa sólo es posible asumiendo que la energía del gradiente electroquímico de protones se utiliza únicamente para la síntesis de ATP. Esta suposición puede ser útil para el cálculo de posibles rendimientos, pero no es realista, ya que la pmf del gradiente de protones no sirve sólo para la síntesis de ATP, sino también para otros procesos y reacciones que requieren energía. Por ejemplo, parte de la energía del gradiente de protones se utiliza para facilitar el transporte de varios metabolitos e iones a través de la membrana y para importar proteínas hacia la mitocondria. En la Figura 10.23 se representan algunos de estos procesos de transporte.

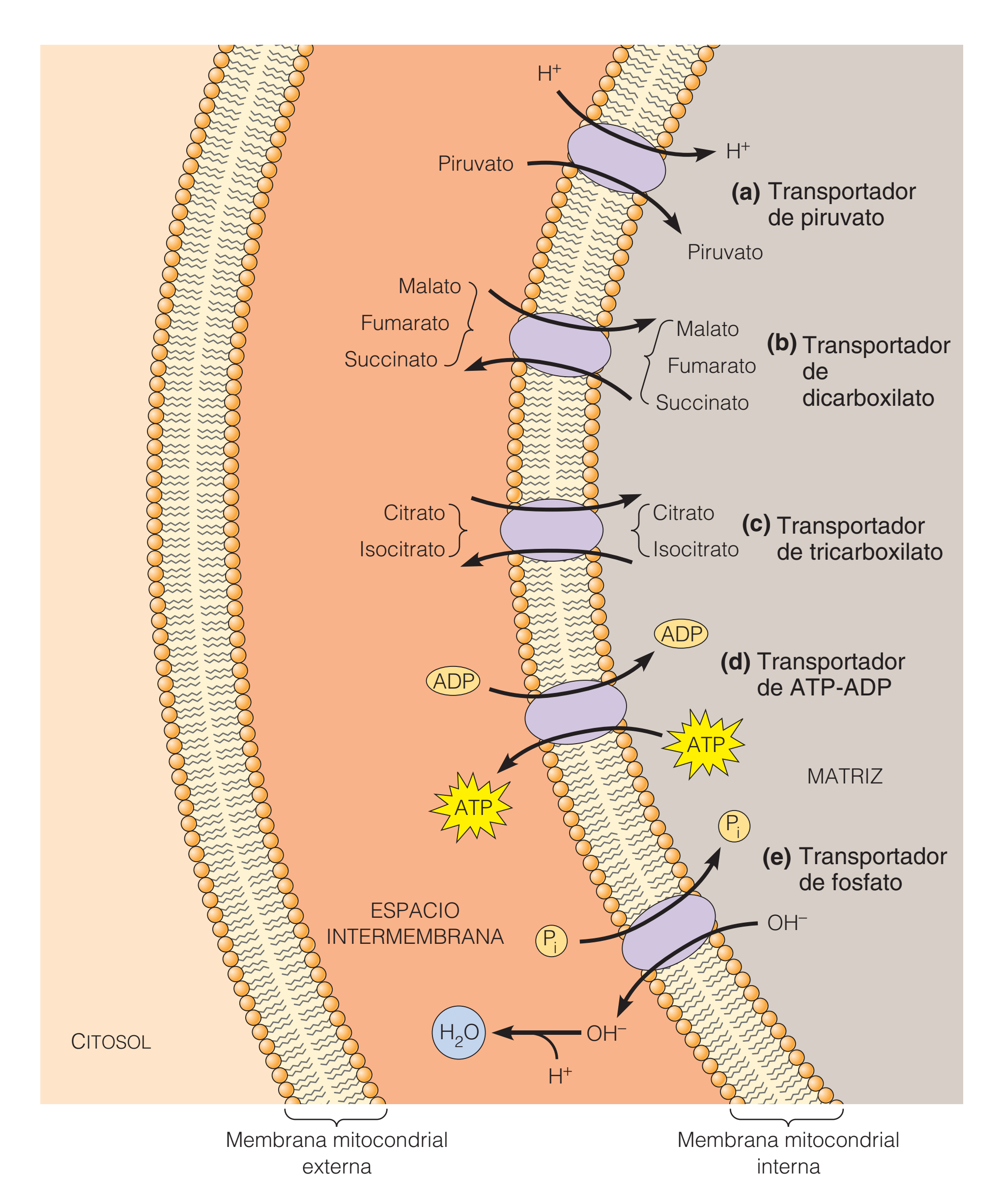


Figura 10.23 Principales sistemas de transporte de la membrana mitocondrial interna. Aquí se muestran las principales proteínas de transporte localizadas en la membrana mitocondrial interna. (**a**) El transportador de piruvato cotransporta piruvato y protones hacia el interior, impulsado por la pmf del gradiente electroquímico de protones. (**b**) Dicarboxilato y (**c**) tricarboxilato transportan ácidos orgánicos a través de la membrana. El sentido del transporte depende de las concentraciones relativas de ácidos di y tricarboxílicos en el interior y en el exterior de la membrana interna respectivamente. (**d**) El transportador de ATP-ADP saca ATP y mete ADP y (**e**) el transportador de fosfato acopla el movimiento de entrada de fosfato con el de salida de iones hidroxilo, que son neutralizados por protones en el espacio intermembrana. (El mecanismo de entrada de electrones se representa en la Figura 10.22.)

Dependiendo de la concentración relativa de piruvato, ácidos grasos, aminoácidos e intermediarios del ciclo del TCA en el citosol y en la matriz mitocondrial, pueden necesitarse cantidades variables de energía para asegurar que la mitocondria tiene los suministros adecuados de sustratos oxidables e intermediarios del ciclo del TCA. Es más, la entrada de iones fosfato necesarios para la síntesis de ATP está acompañada por la salida concomitante de iones hidroxilo, que son neutralizados por los protones en el espacio intermembrana, generando también un gradiente de protones.

La respiración aerobia es un proceso muy eficaz

Para determinar la eficacia general de la producción de ATP en la respiración aerobia tenemos que preguntarnos qué proporción de la energía de oxidación de la glucosa queda en las 36 ó 38 moléculas de ATP generadas por cada molécula de glucosa. El valor de $\Delta G°'$ de la oxidación completa de la glucosa a CO_2 y H_2O es −686 kcal/mol. La hidrólisis de ATP tiene un valor de $\Delta G°'$ de alrededor de −7,3 kcal/mol pero el valor real de $\Delta G'$ suele encontrarse en el rango de −10 a −14 kcal/mol. Asumiendo un valor de 10 kcal/mol como hicimos anteriormente en este capítulo, los 36-38 moles de ATP generados por la respiración aerobia de 1 mol de glucosa en una célula aeróbica corresponden a aproximadamente 360-380 kcal de energía conservada por mol de glucosa oxidada. Esto supone un rendimiento en torno al 52-55%, que es bastante superior a la que podemos obtener de las máquinas más eficientes que somos capaces de fabricar.

Perspectiva

Comparada con la fermentación, la respiración aerobia permite a las células acceder a una proporción mayor de la energía libre que se puede obtener de sustratos orgánicos como azúcares, grasas y proteínas. El catabolismo completo de los carbohidratos comienza con la ruta glucolítica, pero el piruvato que se forma entra después en la mitocondria, donde se descarboxila oxidativamente a acetilCoA. El acetilCoA es oxidado después a CO_2 por las enzimas del ciclo del TCA.

Los ácidos grasos son sustratos alternativos del metabolismo energético en muchas células. Su catabolismo empieza en la matriz mitocondrial con la β oxidación a acetilCoA que entra en el ciclo del TCA. Las proteínas pueden usarse también como fuente de energía, especialmente en condiciones de ayuno. En estos casos, las proteínas se degradan a aminoácidos y éstos son catabolizados a uno o más productos finales que entran en la ruta glucolítica o en el ciclo del TCA.

La mayor parte del rendimiento energético del catabolismo aeróbico de la glucosa se obtiene de las coenzimas reducidas (NADH y $FADH_2$), que son reoxidadas por un sistema de transporte de electrones. Este sistema se compone de complejos respiratorios, que son grandes complejos multiproteicos embebidos en la membrana mitocondrial interna (o, en el caso de los procariotas, en la membrana plasmática). Los complejos respiratorios son libres para moverse lateralmente por la membrana. La coenzima Q y el citocromo *c*, que transfieren electrones entre los complejos, son intermediarios clave del sistema de transporte de electrones. En los organismos aerobios el oxígeno es el aceptor final de electrones y el agua es el producto final.

Tres de los cuatro principales complejos respiratorios, los complejos I, III y IV, acoplan la transferencia de electrones al bombeo de protones hacia fuera de la membrana. Esto establece un gradiente electroquímico de protones que es la fuerza motriz para la producción de ATP. El sistema de síntesis de ATP consta de un transportador de protones, F_o, insertado en la membrana y una ATP sintasa, F_1, cuya estructura protuberante que se proyecta desde la membrana interna del lado de la matriz (o en el lado citosólico de la membrana plasmática de las células procariotas). F_1 sintetiza ATP a medida que el gradiente de protones facilita el movimiento de éstos a través de F_0. Así, el gradiente electroquímico de protones y el ATP son, en efecto, formas interconvertibles de energía almacenada.

La mitocondria es el lugar donde tiene lugar el metabolismo respiratorio en las células eucariotas. Las mitocondrias son orgánulos prominentes tanto en tamaño como en número. Pueden formar grandes redes interconectadas en algunos tipos celulares pero aquí las describimos como orgánulos independientes. Se presentan en un número de entre una y varios cientos o incluso miles por célula y suelen tener una longitud de varias micras. Una mitocondria está rodeada por dos membranas. La membrana interna tiene muchos plegamientos llamados crestas, que incrementan mucho la superficie de la membrana y por lo tanto su capacidad de acomodar los numerosos complejos respiratorios, complejos F_oF_1 y las proteínas de transporte necesarios para llevar a cabo la función respiratoria.

La membrana mitocondrial externa es permeable a los iones y pequeñas moléculas debido a la presencia de porinas. Sin embargo, se requieren transportadores específicos para el transporte de entrada de piruvato, ácidos grasos y otras moléculas orgánicas a través de la membrana interna del orgánulo. El transporte de salida de ATP está acoplado a la entrada de ADP y el movimiento simultáneo de entrada de iones fosfato está acoplado a la salida de iones hidroxilo, facilitado por el gradiente de protones. Los electrones de las moléculas de coenzima que se reducen en el citosol deben entrar al sistema de transporte de electrones por un mecanismo de transporte específico porque la membrana interna no es permeable a las coenzimas.

Éste es, por tanto, el metabolismo aeróbico de la energía. Sin transistores, partes mecánicas, ruido, contaminación, y todo en términos de organización que requieren un microscopio electrónico para visualizarlos. Todo el proceso tiene lugar continuamente en la célula con un grado de integración, eficiencia, fidelidad y control que apenas podemos comprender lo suficientemente bien para apreciarlo totalmente, menos para poder reproducirlo en nuestros tubos de ensayo.

Problemas

Los problemas de mayor dificultad están marcados con un •.

10.1 Localización de moléculas y funciones en la mitocondria. Indique si esperaría encontrar o no (NO), cada una de las siguientes moléculas o funciones en la matriz (MA), membrana interna (IM), membrana externa (OM), o espacio intermembrana (IS) de la mitocondria.

(a) Coenzima A

(b) Coenzima Q

(c) Fosforilación de nucleótidos

(d) Succinato deshidrogenasa

(e) Malato deshidrogenasa

(f) Elongación de ácidos grasos

(g) Transportador de dicarboxilato

(h) Conversión de lactato en piruvato

(i) ATP sintasa

(j) Acumulación de una concentración alta de protones

10.2 Localización de moléculas y funciones en la célula procariota. Repita el Problema 10.1, pero indicando dónde esperaría encontrar cada una de las moléculas o funciones del listado, en la célula procariota. Las posibles localizaciones son: citoplasma (CY), membrana plasmática (PM), exterior celular (EX), o no está presente (NO).

10.3 Verdadero o falso. Señalar cuáles de las siguientes afirmaciones son verdaderas (V) o falsas (F). En las falsas, replantee la afirmación de manera correcta.

(a) El flujo ordenado de carbono en el ciclo del TCA es posible porque cada una de las enzimas del ciclo está englobada en la membrana mitocondrial, de manera que su disposición se ajusta a la propia secuencia del ciclo.

(b) Termodinámicamente, el acetilCoA debería posibilitar la fosforilación del ADP (o del GDP), de la misma forma que lo hace la succinilCoA, asumiendo la disponibilidad de la enzima apropiada.

(c) La respiración es un proceso aeróbico en todos los organismos, porque el oxígeno es el único aceptor de electrones conocido para la reoxidación de las coenzimas.

(d) Podemos predecir el flujo de electrones a través del sistema de transporte de electrones porque el par redox NAD^+/NADH tiene una $\Delta E_0'$ muy negativa y el par tiene una O_2/H_2O $\Delta E_0'$ muy positiva.

(e) A diferencia del NAD^+, la coenzima FAD tiende a estar fuertemente asociada a las deshidrogenasas que lo usan como aceptor de electrones.

(f) Se requieren nueve ciclos de β oxidación para degradar completamente un ácido graso de 18 carbonos hasta acetilCoA.

10.4 Transporte mitocondrial. Para que se dé la respiración aerobia, hay varias sustancias que deben encontrarse en flujo constante a lo largo de la membrana mitocondrial interna. Para una célula del cerebro, en la que la glucosa es la única fuente de energía, indique cuáles de las siguientes sustancias producirían un flujo neto en la membrana y, si es así, cúantas moléculas se movilizarán y en qué sentido, por cada molécula de glucosa catabolizada.

(a) Piruvato

(b) Oxígeno

(c) ATP

(d) ADP

(e) AcetilCoA

(f) Glicerol-3-fosfato

(g) NADH

(h) FADH2

(i) Oxalacetato

(j) Agua

(k) Electrones

(l) Protones

10.5 Completando la ruta. En cada uno de los siguientes casos, complete la ruta, indicando las estructuras y el orden de los intermediarios.

(a) La conversión de citrato en α-cetoglutarato mediante las reacciones TCA-2 y TCA-3 implica como intermediarios, no sólo al isocitrato, sino también a las moléculas identificadas (pero no mostradas en la Figura 10.8), como aconitato y oxalosuccinato. Represente la ruta del citrato a α-cetoglutarato, mostrando las estructuras y el orden de los tres intermediarios.

(b) La síntesis del aminoácido glutamato se puede llevar a cabo a partir de piruvato y alanina mediante la secuencia metabólica que supone el papel anfibólico del ciclo del TCA. Ilustre esa ruta, asumiendo la disponibilidad de cualquier enzima adicional necesaria.

(c) Si se introduce el piruvato-2-^{14}C (piruvato con el carbono central marcado radiactivamente) en la respiración mitocondrial, la mayor parte de la radiactividad se incorporará en el citrato. Trace la ruta por la que los átomos de carbono marcados radiactivamente, se incorporan al citrato e indique la molécula de citrato.

10.6 El biólogo celular calculando. Use la Tabla 10.2 de la página 295 como base para los cálculos necesarios para contestar a las siguientes cuestiones.

(a) Sin hacer cálculos iniciales, prediga si el isocitrato puede ceder electrones exergónicamente al NAD^+ en condiciones estándar. ¿Por qué hace esa predicción?

(b) ¿Cuál es la $\Delta E_0'$ para la oxidación del isocitrato a NAD^+ en condiciones estándar? ¿Confirma este cálculo la predicción que hizo en el apartado a? Explique su respuesta.

(c) Calcule la $\Delta G°'$ para el proceso de oxidación del isocitrato por NAD^+ en condiciones estándar. ¿Por qué es relevante este cálculo para el metabolismo aerobio de la energía?

(d) Repita las partes a-c para la oxidación del lactato a piruvato por NAD^+. ¿Por qué es relevante este cálculo para el metabolismo aerobio de la energía?

(e) Ahora repita las partes a-c para la oxidación del succinato a fumarato, con el NAD^+ como aceptor de electrones. Debería obtener un valor de $\Delta G°'$ muy positivo. ¿Qué nos indica este valor sobre la probabilidad de que el NAD^+ pueda servir como aceptor de electrones para la reacción catalizada por la succinato deshidrogenasa del ciclo del TCA?

(f) Por último, repita las partes a-c para la oxidación del succinato a fumarato con la coenzima Q como aceptor de electrones. ¿Por qué tiene sentido considerar a la coenzima Q como el aceptor de electrones cuando se representa la succinato deshidrogenasa de la Figura 10.8, con el FAD como aceptor inmediato de electrones?

10.7 Calculando los rendimientos máximos de ATP. La Tabla 10.5 es una forma de resumir el rendimiento de ATP durante la oxidación aeróbica de la glucosa.

(a) Complete la Tabla 10.5 para una célula procariota. ¿Cuál es el rendimiento máximo de ATP?

(b) Indique en la Tabla 10.5 los cambios necesarios para calcular el máximo rendimiento de ATP para una célula eucariota que usa la lanzadera glicerol fosfato para transportar los electrones desde el citosol hasta la matriz mitocondrial.

Tabla 10.5 **Cálculo del rendimiento máximo de ATP de la oxidación aeróbica de la glucosa**

Etapa de la respiración	Glucolisis (glucosa → 2 piruvatos)	Oxidación del piruvato (2 piruvatos → 2 acetil CoA)	Ciclo del TCA (2 vueltas)
Rendimiento de CO_2			
Rendimiento de NADH			
ATP a partir de NADH			
Rendimiento de $FADH_2$			
ATP a partir de $FADH_2$			
ATP de la fosforilación desde sustratos			
ATP de la fosforilación oxidativa			
Rendimiento máximo de ATP			

10.8 **Regulación del metabolismo.** Explique la ventaja de cada uno de los siguientes mecanismos de regulación para la célula.

(a) La isocitrato deshidrogenasa (Figura 10.8, reacción TCA-3) es activada alostéricamente por ADP.

(b) Las deshidrogenasas que oxidan isocitrato, α-cetoglutarato y malato (reacciones TCA-3, TCA-4 y TCA-8) están inhibidas alostéricamente por NADH.

(c) La piruvato deshidrogenasa (Figura 18.0, Reacción 10.1) está inhibida alostéricamente por ATP.

(d) La fosfofructoquinasa (Figura 9.6, reacción Gly-3) está inhibida alostéricamente por citrato.

(e) La piruvato deshidrogenasa quinasa (Figura 10.10, enzima E_1) está activada alostéricamente por NADH.

(f) La α-cetoglutarato deshidrogenasa (Figura 10.8, reacción TCA-4) está inhibida alostéricamente por succinil CoA.

10.9 **Síntesis letal.** Las hojas de *Dichapetalum cymosum*, una planta surafricana, son muy venenosas. Los animales que ingieren sus hojas tienen convulsiones y normalmente mueren en poco tiempo. Uno de los efectos más destacados de su toxicidad es un notable incremento en la concentración de citrato y un bloqueo del ciclo del TCA en la mayoría de los órganos del animal afectado. El agente tóxico de las hojas de la planta es el fluoroacetato, pero el veneno real que se encuentra en los tejidos animales es el fluorocitrato. Si se incuba el fluoroacetato con enzimas purificadas del ciclo del TCA, no hay un efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática.

(a) ¿Por qué esperarías que el fluorocitrato tuviese un efecto inhibitorio en una o más enzimas del ciclo del TCA cuando se incuba con las enzimas purificadas in vitro, a pesar de que el fluoroacetato no tiene ningún efecto?

(b) ¿Cuál de las enzimas del ciclo del TCA sospecha que está afectada por el fluorocitrato? Exponga dos razones que argumenten su respuesta.

(c) ¿Cómo se puede convertir el fluoroacetato en fluorocitrato?

(d) ¿Por qué se conoce este fenómeno como *síntesis letal*?

10.10 Oxidación del NADH citosólico. En algunas células eucariotas, el NADH generado por la glucolisis en el citosol es de nuevo reoxidado por la lanzadera del glicerol fosfato que se representa en la Figura 10.22.

(a) Escriba las reacciones ajustadas para la reducción de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a glicerol-3-fosfato (glicerol-3-P) por el NADH citosólico y para la oxidación del glicerol-3-P a DHAP por la glicerol-3-P deshidrogenasa unida a FAD en la membrana mitocondrial interna.

(b) Sume las dos reacciones del apartado (a) para obtener una reacción global de la transferencia de electrones del NADH citosólico al FAD mitocondrial. Calcule la $\Delta E_0'$ y $\Delta G°'$ de esta reacción. ¿Es termodinámicamente factible la entrada de electrones en condiciones estándar?

(c) Escriba una reacción ajustada para la oxidación del $FADH_2$ por la coenzima Q en la membrana interna, asumiendo que la CoQ se reduce a $CoQH_2$. Calcule $\Delta G_0'$ y $\Delta G°'$ de esta reacción. ¿Es esta transferencia termodinámicamente factible en condiciones estándar?

(d) Escriba una reacción ajustada para la transferencia de electrones del NADH citosólico a la CoQ mitocondrial y calcule $\Delta E_0'$ y $\Delta G°'$ de esta reacción. ¿Es esta transferencia termodinámicamente factible en condiciones estándar?

(e) Asuma que la relación [NADH]/[NAD^+] es 5,0 y que la relación [$CoQH_2$]/[CoQ] en la membrana interna es 2,0.

¿Cuál es la $\Delta G'$ de la reacción del apartado (d) a 25 °C y pH 7,0?

(f) ¿Se ve afectada la $\Delta G'$ de la transferencia de electrones del NADH a CoQ por la relación forma reducida/forma oxidada de la enzima dependiente de FAD de la membrana interna? Explique por qué.

•**10.11 Grasa parda y termogenina.** La mayoría de los mamíferos neonatos, incluyendo los bebés humanos, tienen un tipo especial de tejido adiposo denominado *grasa parda*, en el que se encuentra, de forma natural y anclada a la membrana mitocondrial interna, una proteína desacopladora denominada *termogenina*. Esta proteína desacopla el proceso de síntesis de ATP del transporte de electrones, de manera que la energía liberada por el flujo de electrones a través de la cadena de transporte se pierde en forma de calor.

(a) ¿Qué pasa con la energía que se libera cuando continúa el transporte de electrones pero cesa la síntesis de ATP? ¿Por qué puede ser ventajoso para un bebé tener termogenina en la membrana interna de las mitocondrias del tejido adiposo pardo?

(b) Algunos mamíferos adultos presentan también grasa parda. ¿Esperaría encontrar más tejido adiposo pardo y más termogenina en un oso en hibernación que en un oso físicamente activo? Explique su razonamiento.

(c) Dada su localización celular, proponga un modo de acción para la termogenina. ¿Qué tipo de experimento puede sugerir para probar su hipótesis?

(d) ¿Qué le pasaría a un mamífero si todas sus mitocondrias presentaran una proteína desacopladora, aparte de la que se encuentra en el tejido adiposo pardo?

•**10.12 Diseccionando el sistema de transporte de electrones.** Para determinar qué partes del sistema de transporte de electrones (ETS) es responsable del bombeo de protones y por lo tanto de la síntesis de ATP, los investigadores solían incubar las mitocondrias en condiciones en las que sólo es funcional una parte del ETS. Una de las aproximaciones es suministrar a la fracción mitocondrial un donador y un aceptor de electrones que se sabe que bloquean el ETS en puntos concretos. Además, suelen añadirse inhibidores de especificidad conocida. En uno de estos experimentos, la mitocondria se incuba con β–hidroxibutirato, citocromo c oxidado, ADP, P_i y cianida. (La mitocondria tiene una deshidrogenasa dependiente de NAD^+ que es capaz de oxidar β-hidroxibutirato a β-cetobutirato.)

(a) ¿Cuál es el donador de electrones de este sistema? ¿Cuál es el aceptor? ¿Cuál es la ruta de transporte de electrones más probable de este sistema?

(b) Basándose en lo que ya sabe del ETS, ¿cúantos moles de ATP esperaría que se formaran por cada mol de β–hidroxibutirato oxidado? Escriba una ecuación ajustada para la reacción que se da en este sistema.

(c) La cianida es el único agente que se añade al sistema que no es parte de la ecuación ajustada de la reacción. ¿Para qué se añade cianida al sistema? ¿Qué resultado esperaría si no se añadiera cianida?

(d) ¿Esperaría que las enzimas del TCA estuvieran activas en este sistema? Explique su razonamiento.

(e) ¿Por qué es importante que el β-cetobutirato no pueda seguir metabolizándose en este sistema? El lactato es bastante parecido estructuralmente al β-cetobutirato; ¿Qué efecto habría tenido si los investigadores hubieran usado lactato como sustrato oxidable en lugar de β–hidroxibutirato?

Bibliografía recomendada

Las referencias con importancia histórica están marcadas con •.

Referencias generales

Metzler, D. E. *Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells*. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2001.

Morowitz, H., J. Kostelnik y J. D. Yang. The origin of intermediary metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000): 7704.

•Nicholls, D. G. *Bioenergetics: An Introduction to the Chemiosmotic Theory*. New York: Academic Press, 1982.

Orgel, L. E. Self-organizing biochemical cycles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000): 12503.

Papa, S., F. Guerrieri y J. M. Tager, eds. *Frontiers of Cellular Bioenergetics: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiopathology*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999.

•Racker, E. From Pasteur to Mitchell: A hundred years of bioenergetics. *Fed. Proc.* 39 (1980): 210.

Estructura y función mitocondrial

Andre, J. Mitochondria. *Biol. Cell* 80 (1994): 103.

Bereiter-Hahn, J. Behavior of mitochondria in the living cell. *Internat. Rev. Cytol.* 122 (1990): 1.

•Ernster, L. y G. Schatz. Mitochondria: An historical overview. *J. Cell Biol.* 91 (1981): 227s.

Hermann, G. J. y J. M. Shaw. Mitochondrial dynamics in yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14 (1998): 265.

Legros, F., P. Frachon y F. Malka. Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *J. Cell Sci.* 117 (2004): 2653.

Moyes, C. D. Controlling muscle mitochondrial content. *J. Exp. Biol.* 206 (2003): 4385.

El ciclo de los ácidos tricarboxílicos y el transporte de electrones

Beinert, H., R. Holm y E. Münck. Iron-sulfur clusters: Nature's modular, multipurpose structures. *Science* 277 (1997): 653.

Cocchini, G. Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annu. Rev. Biochem.* 72 (2003): 77.

Crane, F. L. y P. Navas. The diversity of coenzyme Q function. *Mol. Aspects Med.* 18 (1997): S1.

Hederstedt, L. Complex II is complex too. *Science* 299 (2003): 671.

Jones, J. G., S. M. Cole y M. A. Solomon. An integrated ^{2}H and ^{13}C NMR study of gluconeogenesis and TCA cycle flux in humans. *Amer. J. Physiol.* 281 (2001): E848.

• Kornberg, H. L. Tricarboxylic acid cycles. *Bioessays* 7 (1987): 236.

• Krebs, H. A. The history of the tricarboxylic acid cycle. *Perspect. Biol. Med.* 14 (1970): 154.

• Mitchell, P. Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science* 206 (1979): 1148.

Norman, C., K. A. Howell y A. H. Millar. Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport. *Plant Physiol.* 134 (2004): 492.

Reed, J. C. Cytochrome *c*: Can't live with it—can't live without it. *Cell* 91 (1997): 559.

Schnarrenberger, C. y W. Martin. Evolution of the enzymes of the citric acid cycle and the glyoxylate cycle of higher plants. A case study of endosymbiotic gene transfer. *Eur. J. Biochem.* 269 (2002): 868.

Schultz, B. E. y S. I. Chan. Structures and proton pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30 (2001): 23.

Smith, J. 1998. The secret life of cytochrome bc_1 *Science* 281 (1998): 58.

Williams, R. Bioenergetics: Purpose of proton pathways. *Nature* 376 (1996): 643.

Fosforilación oxidativa y síntesis de ATP

Boyer, P. D. A research journey with ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 277 (2002): 39045.

Elston, T., H. Wang, and G. Oster. Energy transduction in ATP synthase. *Nature* 391 (1998): 510.

Itoh, H., K. Adachi y A. Takahashi. Mechanically driven ATP synthesis by F_1-ATPase. *Nature* 427 (2004): 465.

Jubrias, S. A., G. J. Crowther y E. G. Shankland. Acidosis inhibits oxidative phosphorylation in contracting human skeletal muscle in vivo. *J. Physiol.* 553 (2003): 589.

Kinosita, K., R. Yasuda, H. Noji, S. Ishiwata y M. Yoshida. F_1-ATPase A rotary motor made of a single molecule. *Cell* 93 (1998): 21.

• Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* 191 (1961): 144.

Rubinstein, J. L., R. Henderson y J. E. Walker. Structure of the mitochondrial ATP synthase by electron cryomicroscopy. *EMBO J.* 22 (2003): 6182.

Saraste, M. Oxidative phosphorylation at the *fin de siecle. Science* 283 (1999): 1488.

Weber, J., A. E. Senior y S. Wilke-Mounts. Identification of the F_1-binding surface on the d-subunit of ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 278 (2003): 13409.

Regulación del metabolismo respiratorio

Blank, L. M. y U. Sauer. TCA cycle activity in *Saccharomyces cereviseae* is a function of the environmentally determined specific growth and glucose uptake rates. *Microbiol.* 150 (2004): 1085.

Brown, G. C. Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. *Biochem. J.* 284 (1992): 1.

Lascaris, R., J. Piwowarski y H. van der Spek. Overexpression of HAP4 in glucose-derepressed yeast cells reveals respiratory control of glucose-regulated genes. *Microbiol.* 150 (2004): 929.

Sheehan, T. E., D. A. Hood y P. A. Kumar. Tissue-specific regulation of cytochrome *c* oxidase subunit expression by thyroid hormone. *Amer. J. Physiol.* 286 (2004): E968.

11

El metabolismo fototrófico de la energía: fotosíntesis

En los dos capítulos precedentes, estudiamos la fermentación y la respiración, dos soluciones quimiótrofas que satisfacen el desafío universal de las necesidades de energía y de carbono de las células vivas. La mayoría de los quimiótrofos dependen de los sustratos orgánicos para la supervivencia, aunque unos pocos quimiótrofos procariotas pueden adquirir la energía, e incluso el carbono reducido, a partir de moléculas inorgánicas. Los quimiótrofos (los humanos incluidos), como puede recordar, obtienen energía mediante la oxidación de compuestos reducidos de alta energía tales como los carbohidratos, las grasas y las proteínas. También pueden usar intermediarios de esas vías oxidativas como fuentes del esqueleto de carbonos para la biosíntesis. Sin embargo, dejándolos solos, los quimiótrofos podrían perecer pronto sin un suministro continuo de componentes orgánicos reducidos.

En este capítulo aprenderemos cómo los quimiótrofos consumen energía química y carbono orgánico de la biosfera que vuelve a incorporarse por los organismos fotosintéticos. Estos organismos fotosintéticos usan la energía solar para conducir la reducción de CO_2 (la forma más oxidada del carbono) para producir carbohidratos, grasas, y proteínas —las formas reducidas del carbono de las cuales dependen todos los quimiótrofos—.

El uso de la energía solar para producir estos bloques de construcción de vida reducidos se llama acertadamente **fotosíntesis** —la conversión de la energía solar en energía química, y su uso posterior en la síntesis de moléculas orgánicas—. Casi toda la vida en la tierra se sostiene mediante la cascada de energía que llega por la luz del sol al planeta. Los **fotótrofos** son organismos que convierten la energía solar en energía química en forma de ATP. Algunos fotótrofos, tales como las halobacterias descritas en el Capítulo 7, se conocen como **fotoheterótrofos**, organismos que adquieren la energía a partir de la luz del sol, pero que dependen de fuentes orgánicas de carbono. Muchos otros fotótrofos —incluidas plantas, algas y muchas bacterias fotosintéticas— se conocen como **fotoautótrofos,** organismos que usan la energía solar para conducir la biosíntesis de las moléculas orgánicas ricas en energía desde materiales iniciales inorgánicos simples: dióxido de carbono y agua. Muchos fotoautótrofos, llamados apropiadamente *fotótrofos oxigénicos*, liberan oxígeno molecular como producto de la fotosíntesis. Así, los fotótrofos no sólo vuelven a incorporar el carbono reducido a la biosfera sino también proporcionan oxígeno molecular a la atmósfera, completando el flujo cíclico de energía y de carbono, introducido en el Capítulo 5.

En este capítulo, estudiaremos dos aspectos generales de la fotosíntesis: cómo los fotótrofos capturan la energía solar y la convierten en energía química, y cómo esta energía se usa para transformar el dióxido de carbono, pobre en energía, y el agua en moléculas orgánicas ricas en energía, como los carbohidratos, las grasas y las proteínas.

Una visión general de la fotosíntesis

La fotosíntesis implica dos procesos bioquímicos principales: la transducción de la energía y la asimilación de carbono (Figura 11.1). La energía luminosa se capta, durante las **reacciones de transducción de energía**, por las moléculas de clorofila y se convierte en energía química en forma de ATP y de coenzima NADPH reducido. El ATP y el NADPH, generados por las reacciones de transducción de energía, proporcionan posteriormente la energía y poder reductor necesarios para las **reacciones de asimilación del**

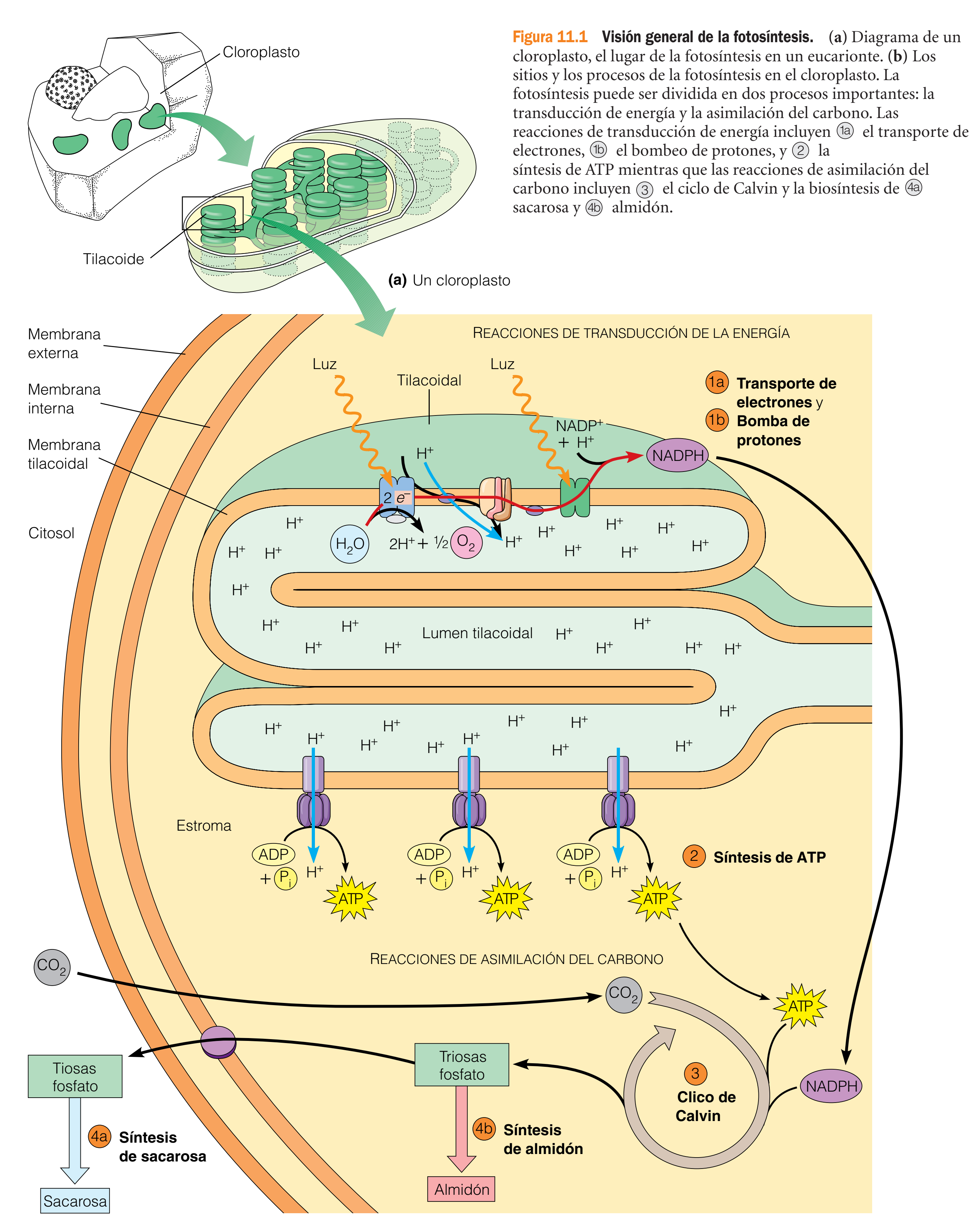


Figura 11.1 Visión general de la fotosíntesis. (**a**) Diagrama de un cloroplasto, el lugar de la fotosíntesis en un eucarionte. (**b**) Los sitios y los procesos de la fotosíntesis en el cloroplasto. La fotosíntesis puede ser dividida en dos procesos importantes: la transducción de energía y la asimilación del carbono. Las reacciones de transducción de energía incluyen (1a) el transporte de electrones, (1b) el bombeo de protones, y (2) la síntesis de ATP mientras que las reacciones de asimilación del carbono incluyen (3) el ciclo de Calvin y la biosíntesis de (4a) sacarosa y (4b) almidón.

carbono. Los átomos de carbono del dióxido de carbono, completamente oxidados, se fijan (reducidos o agregados covalentemente), durante las reacciones de asimilación del carbono, comúnmente llamadas *ciclo de Calvin*, a moléculas orgánicas aceptoras y después se reorganizan para formar carbohidratos y otros compuestos orgánicos necesarios para construir una célula viva.

La energía solar se captura por los miembros de una familia de moléculas pigmentarias verdes llamadas *clorofilas*, las cuales desempeñan un papel clave en toda la vía de transducción de energía de los fotoautótrofos. Las clorofilas están presentes en las hojas verdes de las plantas así como en las células de algas y bacterias fotosintéticas. La absorción de luz por la molécula de clorofila excita uno de sus electrones, el cual entonces se expulsa desde la molécula y fluye a favor de gradiente energético a través de un sistema de transporte de electrones (ETS) muy parecido al ETS que vimos previamente en la mitocondria. Este flujo de electrones, como en la mitocondria, está unido a una bomba de protones unidireccional, la cual almacena la energía en un gradiente electroquímico de protones que conduce a la síntesis de ATP. En la mitocondria, como puede recordar, este proceso se conoce como fosforilación oxidativa —la síntesis de ATP impulsada por la energía obtenida desde la oxidación de los compuestos orgánicos—. En los organismos fotosintéticos, la síntesis de ATP impulsada por la energía obtenida por el sol se llama **fotofosforilación.**

Los fotoautótrofos necesitan, para incorporar los átomos de carbono completamente oxidados desde el dióxido de carbono en moléculas orgánicas, no sólo ATP sino también NADPH, la forma reducida de la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato ($NADP^+$). En los **fotótrofos oxigénicos —**plantas, algas y cianobacterias— la energía lumínica absorbida por la clorofila y otras moléculas pigmentarias impulsa el movimiento de electrones desde el agua, que tiene un potencial de reducción muy positivo, a la *ferredoxina*, la cual tiene un potencial de reducción muy negativo. Luego, los electrones viajan exergónicamente desde la ferredoxina al $NADP^+$, generando de ese modo NADPH. En los **fotótrofos anoxigénicos** —bacterias verdes y purpúreas— compuestos con potenciales de reducción menos positivos que el agua, tales como el ion hidrógeno sulfuro (SH^-), el ion tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$), o el succinato, sirven como donadores de electrones. La generación de NADPH dependiente de la luz se llama **fotorreducción,** en fototótrofos oxigénicos y anoxigénicos**.**

La mayoría de la energía acumulada dentro de las células fotosintéticas por la generación de ATP y NADPH dependiente de la luz se usa para la fijación y la reducción del dióxido de carbono. La reacción general del proceso completo de la fotosíntesis se puede expresar como

$$\text{Luz} + CO_2 + 2H_2A \rightarrow [CH_2O] + 2A + H_2O \qquad \textbf{(11.1)}$$

donde H_2A es un donador de electrones adecuado, $[CH_2O]$ representa una molécula orgánica de carbono en el nivel de oxidación de un alcohol (como en la glucosa), y A es la forma oxidada del donador del electrón. Mediante esta expresión de la fotosíntesis evitamos perpetuar la idea incorrecta de que todos los fotoautótrofos usan el agua como donador de electrones.

Cuando nos centramos en los fotótrofos oxigénicos, los cuales usan agua como donador de electrones, podemos reescribir la Reacción 11.1 más familiar y específicamente de la siguiente forma:

$$\text{Luz} + CO_2 + 6H_2O \rightarrow C_3H_6O_3 + 3O_2 + H_2O \qquad \textbf{(11.2)}$$

El producto intermedio de la fotosíntesis es, como indicamos en la Reacción 11.2, un carbohidrato de tres carbonos conocido como triosa fosfato. En este punto, las triosas fosfato se incorporan en distintas vías biosíntesis. Las vías más importantes que consideraremos son la biosíntesis de sacarosa y almidón. La sacarosa transporta la energía y el carbono reducido desde las células fotosintéticas a las células no fotosintéticas y, por lo tanto, es la mejor transportadora de carbohidratos en la mayoría de las especies de plantas. Por otro lado, el almidón, o el glucógeno en bacterias fotosintéticas, se acumulan cuando la asimilación de carbono fotosintético excede la demanda de energía y de carbono de un fotoautótrofo y es por tanto el mejor almacenamiento de los carbohidratos.

Nuestros organismos modelo para estudiar la fotosíntesis en este capítulo son la mayoría de las familias de los fotótrofos oxigénicos —las plantas verdes—. Por tanto, miraremos la estructura y la función del *cloroplasto*, los orgánulos responsables de la mayoría de los acontecimientos de la fotosíntesis en los fotótrofos eucariontes.

El cloroplasto: un orgánulo fotosintético

Los acontecimientos principales de la transducción de energía fotosintética y de la asimilación del carbono se restringen, en plantas y algas, a orgánulos especializados, llamados **cloroplastos.** Fueron descritos y estudiados pronto en la historia de la biología celular por Antonie van Leeuwenhoek y Nehemiah Grez en el siglo XVII, debido a que los cloroplastos son normalmente grandes (1-5 μm de ancho y 1-10 μm de largo) y opacos. La importancia de los cloroplastos dentro de una célula fotosintética se ilustra claramente en la Figura 11.2a, en la micrográfica electrónica de una célula de la hoja de *Coleus.* Una célula de una hoja madura contiene normalmente 20-100 cloroplastos, mientras que una célula típica de un alga contiene sólo uno o unos pocos cloroplastos. La forma de estos orgánulos varía desde esferas simples aplastadas, comunes en plantas, a formas más elaboradas encontradas en las algas verdes. Por ejemplo, una célula del alga verde filamentosa *Spirogyra* contiene uno o más cloroplastos en formas de cinta, como se muestra en la Figura 11.2b.

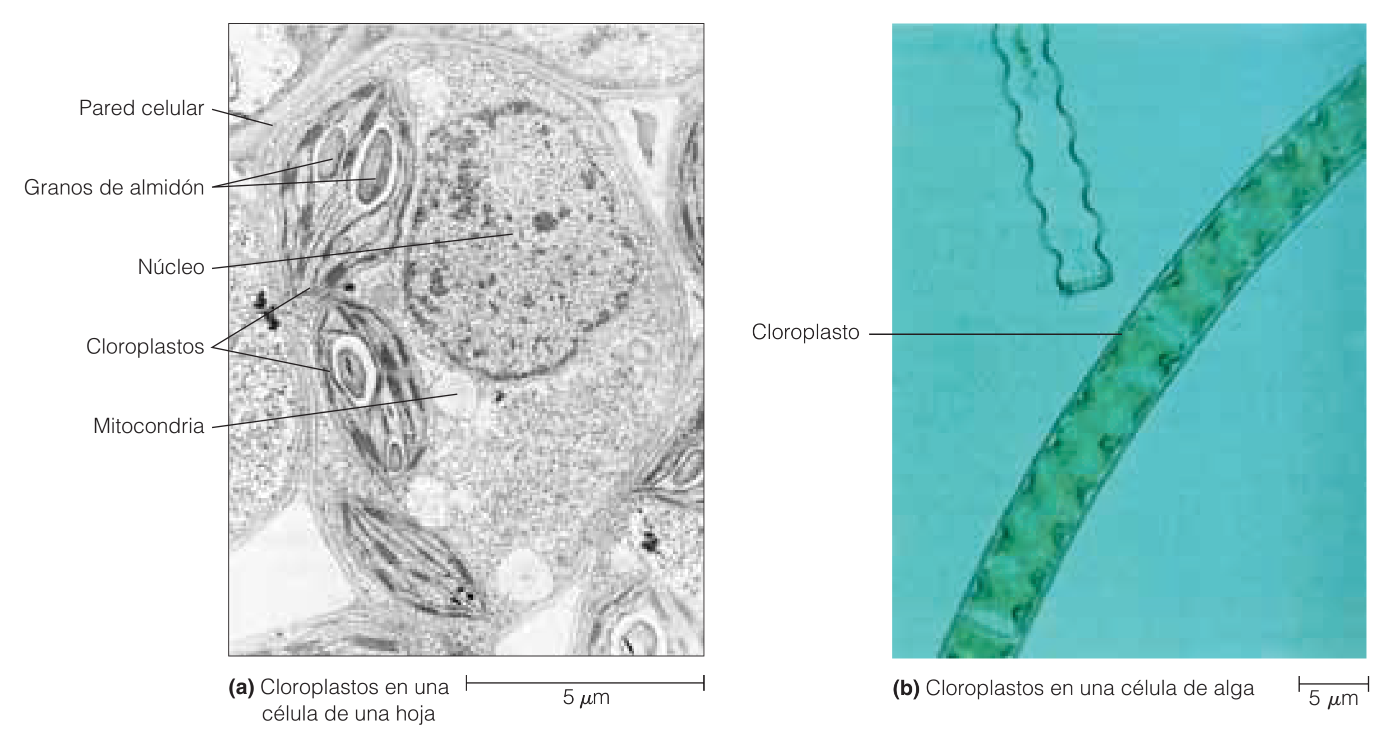


Figura 11.2 Cloroplastos. (**a**) La abundancia de un cloroplasto en una hoja de una célula de una planta se demuestra por micrografía electrónica de una célula parenquimática de una hoja de *Coleus.* La célula contiene muchos cloroplastos, tres de los cuales se ven en esta sección transversal en particular. La presencia de gránulos alargados de almidón en los cloroplastos indica que la célula estaba activa fotosintéticamente antes de la fijación para el microscopio electrónico (TEM). (**b**) Esta imagen de miroscopía óptica revela los cloroplastos poco comunes en forma de cinta de los filamentos del alga verde *Spirogyra.*

No todas las células de las plantas contienen cloroplastos. Las células de plantas recién diferenciadas tienen orgánulos más pequeños llamados **protoplastidios,** los cuales pueden desarrollarse en diferentes tipos de **plastidios** equipados para desempeñar diferentes funciones. Los cloroplastos son sólo un ejemplo de plastidio. Algunos protoplastidios se diferencian en *amiloplastos*, los cuales son lugares de almacenamiento de almidón. Otros protoplastidios adquieren pigmentos rojos, naranjas o amarillos, formando los *cromoplastos* que producen en flores y frutos sus colores distintivos. Los protoplastidios pueden también dar lugar a orgánulos para almacenar proteínas (*proteinoplastos*) o lípidos (*elaioplastos).*

Los cloroplastos están compuestos por tres sistemas de membranas

La micrografía electrónica de la Figura 11.3a muestra una visión más cercana de un cloroplasto de una célula de una hoja de una planta. Un cloroplasto, como una mitocondria, tiene una **membrana externa** y una **membrana interna**, a menudo separada por un estrecho **espacio intermembrana** (Figura 11.3b). La membrana interna encierra el **estroma**, una matriz tipo gel con una gran cantidad de enzimas para la asimilación de carbono, nitrógeno y sulfuro. La membrana externa contiene **porinas**, proteínas transmembrana que permiten el paso de solutos con un peso molecular de aproximadamente 5.000 daltons. La membrana externa es por tanto libremente permeable a muchas moléculas orgánicas pequeñas e iones, pero la membrana interna establece una barrera de permeabilidad significativa. Las proteínas transportadoras controlan el flujo de la mayoría de los metabolitos entre el espacio intermembrana y el estroma. Sin embargo, los tres metabolitos importantes que son capaces de difundir libremente a través de la membrana externa e interna, son el agua, el dióxido de carbono y el oxígeno.

El cloroplasto, a diferencia de la mitocondria, tiene un tercer sistema de membranas, los **tilacoides**, mostrados en la Figura 11.3, c y d. Los tilacoides son, estructuras aplanadas en forma de saco suspendidos en el estroma, y normalmente ordenados en montones llamados **grana** (singular; **granum**). Los grana, que se parecen a sacos de monedas, se interconectan por una red de tilacoides más largos llamados **tilacoides del estroma.**

Todos los pigmentos fotosintéticos, las enzimas requeridas para las fotorreacciones, los transportadores implicados en el transporte de electrones, y las proteínas que acoplan el transporte de electrones con el bombeo de protones y de la síntesis de ATP se localizan sobre o en las membranas tilacoides.

La micrografía electrónica de las secciones seriadas muestra que los grana y el estroma tilacoidal encierran o li-

Membranas externa e interna
Estroma
Grana
Tilacoides del estroma
(a) Cloroplasto
1 μm

Membrana externa
Espacio intermembrana
Membrana interna
Estroma
Granum (montones de tilacoides)
Tilacoide
Tilacoide del estroma
(b) Diagrama del interior de un cloroplasto

Tilacoide
Tilacoides del estroma
Estroma
Granum
(c) Micrografía electrónica de la grana y los tilacoides del estroma
0,5 μm

Lumen del tilacoide
Tilacoides
Granum
Tilacoides del estroma
(d) Diagrama de lo tilacoides de los grana y del estroma

Figura 11.3 Propiedadas estructurales de un cloroplasto. (**a**) Micrografía electrónica de un cloroplasto de una hoja de la hierba (*Phelum pratense*) (TEM). (**b**) Diagrama que muestra la estructura tri-dimensional de un cloroplasto típico (**c**) Micrografía electrónica más ampliada del cloroplasto de la figura a, mostrando la disposición de los tilacoides de los grana y del estroma tilacoidal (TEM). (**d**) Diagrama que representa la continuidad de las membranas tilacoides, la colocación de los tilacoides en montones llamados grana, y el estroma tilacoidal que interconecta la grana. Las membranas tilacoidades limitan un compartimiento separado llamado el lumen tilacoidal.

mitan a un compartimiento único y continuo, el **lumen tilacoidal**. La separación del lumen del estroma por la membrana tilacoidal desempeña un papel importante en la generación de un gradiente electroquímico de protones y en la síntesis de ATP, porque los protones bombeados hacia el lumen durante el transporte de electrones conducidos por la luz conduce la síntesis de ATP cuando regresan de nuevo al estroma.

Los procariotas fotosintéticos no tienen cloroplastos. Sin embargo, algunos de ellos, como las cianobacterias, tienen la membrana plasmática plegada hacia el interior formando **membranas fotosintéticas.** Tales estructuras, mostradas en la Figura 11.4, son análogas a los tilacoides. Es más, hasta cierto punto las cianobacterias parecen ser cloroplastos que viven libremente. Las similitudes entre las mitocondrias, los cloroplastos y las células bacterianas han llevado a los biólogos a formular la *teoría endosimbiótica*, la cual sugiere que las mitocondrias y los cloroplastos evolucionaron a partir de bacterias que fueron invaginadas por células primitivas hace 1 o 2 mil millones de años. En el Anexo 11A se resume esta teoría.

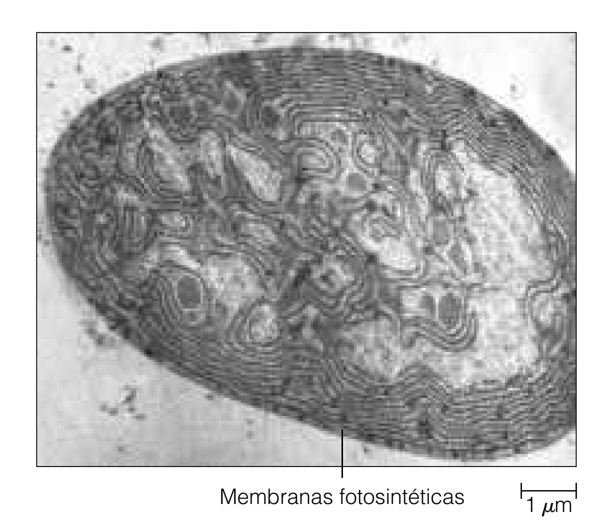


Figura 11.4 Membranas fotosintéticas de una cianobacteria. La cianobacterias, como otros fotoautótrofos, son capaz de fijar carbono fotosintético. Esta micrografía electrónica de una sección fina de *Anabaena azollae* revela el extenso plagamiento de la membrana de las células de cianobacterias que se parece a los tilacoides de un cloroplasto (TEM).

Teoría endosimbionte y la evolución de las mitocondrias y cloroplastos a partir de bacterias primitivas

El debate sobre los orígenes de la evolución de las mitocondrias y los cloroplastos tiene una larga historia. Ya en 1883, Andreas F.W. Schimper sugirió que los cloroplastos surgieron de una relación simbionte entre bacterias fotosintéticas y unas células no fotosintéticas. A mediados de 1920, otros investigadores ampliaron la idea de Schimper proponiendo un origen simbiótico para las mitocondrias. Sin embargo, tales ideas tropezaron con burlas y negligencias durante décadas, hasta los años 60, cuando se descubrió que las mitocondrias y los cloroplastos contienen su propio ADN. Otras investigaciones posteriores revelaron que las mitocondrias y los cloroplastos eran **orgánulos semiautónomos**, que pueden sintetizar proteínas y dividirse por sí mismos, y contienen no sólo DNA, sino también mRNA, tsRNA y ribosomas.

El descubrimiento gradual de que la síntesis de DNA, RNA, y proteínas en las mitocondrias y los cloroplastos tiene más similitudes con dichos procesos en células procariotas que con los que se producen en el núcleo o citoplasma de las células eucariotas condujeron a los biólogos a formular la **teoría endosimbionte.** Esta teoría, desarrollada fundamentalmente por Lynn Margullis, propone que las mitocondrias y los cloroplastos evolucionaron desde un procarionte primitivo que estableció una **relación simbiótica** (una asociación mutuamente beneficiosa) con células nucleadas primitivas hace 1 o 2 mil millones de años. La secuencia propuesta de acontecimientos que dieron lugar a las mitocondrias y los cloroplastos se resume en la Figura 11A.1.

Un supuesto preliminar de la teoría endosimbionte es que la falta de oxígeno molecular en la atmósfera primitiva de la Tierra limitó las primeras células a mecanismos *anaerobios* para adquirir energía. Posteriormente unas pocas células anaerobias desarrollaron pigmentos capaces de convertir la energía luminosa en energía química, permitiendo entonces usar la luz del sol como una fuente de energía. Los primeros organismos fotosintéticos probablemente usaron sulfuro de hidrógeno o hidrógeno molecular como donadores de electrones, pero algunos de sus primeros descendientes desarrollaron mecanismos para usar el agua como donador de electrones. Como resultado, el oxigeno se liberó y la composición de la atmósfera de la tierra se alteró drásticamente.

A medida que el oxígeno se acumuló en la atmósfera de la Tierra algunas bacterias anaerobias evolucionaron a organismos *aerobios* mediante el desarrollo de transportadores de electrones dependientes de oxígeno y vías de fosforilación oxidativa. En este punto, el escenario quedó listo para la aparición de las células eucariotas. La teoría endosimbionte sugiere que el antepasado de las células eucariontes (llamado **protoeucariota**) desarrolló al menos una característica importante distinguiéndolo de otras células primitivas; la capacidad para ingerir nutrientes del medio ambiente por fagocitosis. Esta característica permitió a los protoecuariotas establecer relaciones endosimbiontes con las bacterias primitivas. Todavía no está claro cómo estas células primitivas adquirieron un núcleo limitado por membrana. El núcleo celular pudo haberse originado por endocitosis a partir de la membrana plasmática.

La mitocondria aparentemente evolucionó a partir una bacteria purpúrea primitiva

El primer paso hacia la evolución de la mitocondria pudo haber ocurrido cuando un protoecuariota ingirió pequeñas bacterias **aerobias** por fagocitosis (Figura 11A.1). Algunos científicos creen que antes de este acontecimiento, los protoecuariotas eran anaerobios y dependían completamente de la glucolisis para la obtención de energía. Las bacterias aeróbicas ingeridas, con sus vías de transporte de electrones de fosforilación oxidativa, podría haber provisto de mayor cantidad de energía útil que las que las células protoeucariotas podrían producir únicamente mediante la glucolisis. A cambio, la célula huésped proporcionó protección y nutrientes a las bacterias residentes en su citoplasma. Las bacterias ingeridas y el protoecuariota, ambos beneficiados de la asociación, establecieron una relación simbionte estable. A medida que las bacterias citoplasmáticas y la célula huésped se adaptaron para vivir juntas durante cientos de millones de años, la bacteria gradualmente perdió las funciones que no eran esenciales en su nuevo medio citoplasmático y se transformó en una mitocondria. Para determinar qué tipo de bacteria podría haber establecido este escenario, se ha comparado la secuencia de bases de RNAs ribosomal mitocondrial actual (RNArs) con la secuencia de bases de varios RNArs bacteriano. La coincidencia más próxima ocurre con *las bacterias purpúreas*, lo que sugiere que el precursor ancestral de mitocondria ingerida era un miembro primitivo de este grupo.

Los cloroplastos aparentemente evolucionaron a partir de una cianobacteria primitiva

De acuerdo con la teoría endosimbionte, el primer paso hacia la evolución de los cloroplastos ocurrió cuando los miembros de un subgrupo de eucariotas primitivo, ya equipados con una bacteria aerobia o mitocondria primitiva, ingirieron células fotosintéticas primitivas. Como acabamos de describir para la evolución de la mitocondria, los organismos ingeridos probablemente proporcionaron una vía útil para satisfacer las necesidades energéticas de la célula huésped a cambio de cobijo y nutrientes. Las células fotosintéticas gradualmente perdieron las funciones que no eran esenciales en su nuevo ambiente y evolucionaron hacia un componente integrante del huésped eucarionte. Para determinar qué clase de bacteria fotosintética podría haberse implicado en este escenario se ha comparado la secuencia de bases de rRNAs del cloroplasto, como en el caso del rRNAs mitocondrial, con la secuencia de bases de varios rRNAs bacterianos. En este caso, las coincidencias más próximas tienen lugar con las *cianobacterisa*, lo que sugiere que el precursor del primitivo ingerido era un miembro primitivo de este grupo.

Los cloroplastos presentes en distintos eucariotas fototrópicos, sin embargo, muestran variaciones bioquímicas y

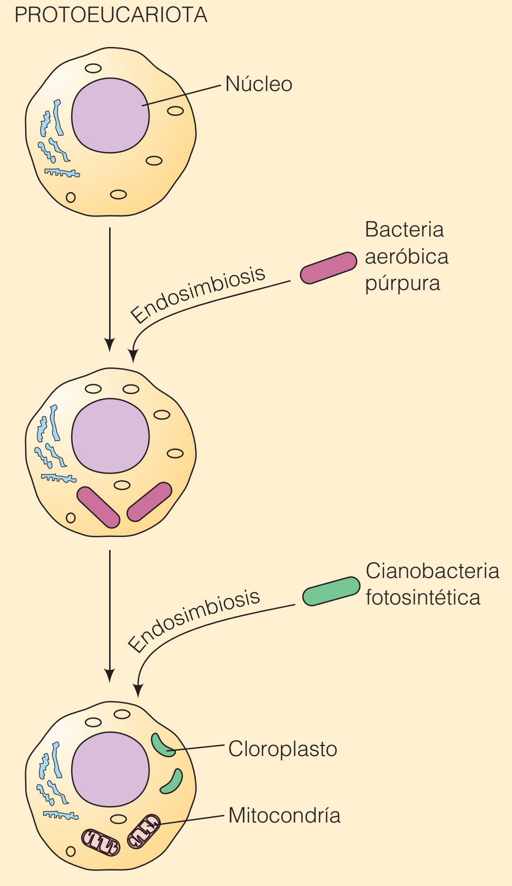


Figura 11A.1 Acontecimientos más importantes que pueden haber ocurrido durante la evolución de las células eucariotas. Existen considerables evidencias para un origen endosimbionte de las mitocondrias y el cloroplasto. La mayoría de los biólogos están de acuerdo en que las bacterias púrpuras y la cianobacterias fueron, respectivamente, las células primitivas ingeridas por los protoeucariotas y luego evolucionaron para producir mitocondrias o cloroplastos. Esto está basado en las similitudes de tamaño y de composición lipídica de la membrana, comparando el orden de bases del ARNr, la presencia de moléculas de ADN circular y la capacidad de reproducirse de manera autónoma.

estructurales que llevan a algunos biólogos que estudian la evolución a preguntarse si la ingestión de células fotosintéticas y su desarrollo posterior hacia cloroplastos ocurrió más de una vez durante la evolución de las células eucariontes. Considere, por ejemplo, los pigmentos que absorben luz presentes en los cloroplastos de diferentes eucariotas fototróficos. Los pigmentos más importantes empleados para la fotosíntesis son las clorofilas *a* y *b* en plantas superiores y en las algas verdes, la clorofila *a* y las ficobilinas en algas rojas, y las clorofilas *a* y *c* en algas pardas, dinoflagelados y diatomeas. ¿Significa esto que tres clases diferentes de bacterias fotosintéticas primitivas, cada una con una combinación distinta de pigmentos, establecieron relaciones simbióticas con los eucariotas primitivos? La clorofila *a* y las ficobilinas se usan en cianobacterias actuales, mientras que las clorofilas *a* y *b* se usan en un grupo estrechamente relacionado de bacterias llamadas proclorofitas. Aunque la secuencia de bases de los RNArs de los cianobacterias es la opción más parecida a los rRNAs de cloroplastos de las plantas superiores y las algas verdes actuales, los rRNAs de las proclorofitas son también muy similares a los de los cloroplastos actuales lo que no parece excluir a miembros primitivos de cualquiera de los grupos como candidatos para el precursor o precursores simbiontes que evolucionaron hacia los cloroplastos.

La teoría endosimbionte se basa ante todo en similitudes bioquímicas observadas entre las mitocondrias, los cloroplastos, y las bacterias, pero también es apoyada por relaciones simbiontes actuales que parece ser lo que podría haber ocurrido en el pasado lejano. Las algas, los dinoflagelados, las diatomeas y los procariotas fotosintéticos viven como endosimbiontes en el citoplasma de células en más de 150 tipos diferentes de protistas e invertebrados existentes actualmente. La pared celular del organismo ingerido a menudo ya no está presente, y en pocos casos la estructura celular está más reducida incluso, permaneciendo únicamente los cloroplastos del endosimbionte.

Un ejemplo llamativo de endosimbiosis ocurre en ciertas babosas marinas y moluscos relacionados, donde las células que revisten el tracto digestivo del animal contienen cloroplastos claramente identificables. Estos cloroplastos que tienen su origen en las algas verdes de las que se alimentan los moluscos, y que continúan llevando a cabo la fotosíntesis durante mucho tiempo después de haberse incorporado en las células del animal. Los carbohidratos producidos por el proceso fotosintético se distribuyen incluso como una fuente de nutrientes para el resto del organismo. Los orgánulos continúan funcionando en el citoplasma de la célula animal durante varios meses, aunque los cloroplastos no crecen ni se dividen. El descubrimiento de que los cloroplastos procedentes de las algas son ingeridos por las células del animal y que asumen una relación simbiótica estable proporciona soporte a la idea de que los cloroplastos pueden haber evolucionado de las asociaciones endosimbióticas entre las bacterias fotosintéticas primitivas y los eucariotas primitivos.

En el análisis final, nuestras ideas sobre cómo las células eucariotas adquieren su complejo repertorio de orgánulos durante más de mil millones de años de evolución debe permanecer especulativo, ya que los acontecimientos que debemos considerar son inaccesibles para la experimentación directa en el laboratorio. Sin embargo, uno de los puntos fuertes del papel de la endosimbiosis como origen de la evolución de los orgánulos eucariotas es el hecho de que está implicada en interacciones y procesos que se observan en las células actuales.

La transducción de energía fotosintética

Necesitamos entender la naturaleza de la luz (radiación electromagnética) y su interacción con las moléculas, para entender cómo la energía luminosa se convierte en energía química dentro de un cloroplasto o de una bacteria. La luz se considera a menudo una onda; la porción visible del espectro electromagnético con longitudes de ondas que oscilan aproximadamente entre 380 a 750 nm. Sin embargo, la luz también se comporta como un flujo de partículas diferenciadas llamadas **protones**, cada protón es portador de un **quanto** (paquete indivisible) de energía. La longitud de onda de un fotón y la cantidad exacta energía que porta se relacionan inversamente (*véase* Figura 2.3). Un fotón de luz ultravioleta o azul, por ejemplo, tiene una longitud de onda más corta y lleva un quanto de energía más grande que un fotón de luz roja o infrarroja.

Cuando un fotón se absorbe por un **pigmento** (molécula absorbente de luz), como es la clorofila, la energía del fotón se traslada a un electrón, el cual es energizado desde su *estado basal* en un orbital de baja energía a un *estado excitado* en un orbital de alta energía. Este acontecimiento, llamado **fotoexcitación,** es el primer paso en la fotosíntesis. Los pigmentos muestran espectros de absorción característicos, debido a que cada pigmento tiene una configuración diferente de electrones, y a que los orbitales electrónicos se caracterizan por niveles de energía diferentes. Las longitudes de onda de la luz absorbida por un pigmento se corresponden con las transiciones de orbital que pueden experimentar los electrones en la molécula. En la Figura 11.5 se muestra el espectro de absorción de varios pigmentos presentes comúnmente en los organismos fotosintéticos, junto con el espectro de la radiación solar que alcanza la superficie de la tierra.

Un electrón fotoexcitado en una molécula de pigmento no es estable, y debe regresar a su estado basal en un orbital de baja energía o experimentar la transferencia a un orbital de alta energía relativamente estable, normalmente en una molécula diferente. Cuando el electrón regresa a un orbital de baja energía en la molécula de pigmento, la energía absorbida tiene dos destinos potenciales. Frecuentemente, la energía de excitación se pierde cuando la molécula de pigmento libera una combinación de calor y un fotón que lleva un quanto de energía más pequeño (fluorescencia). Como alternativa, la mayoría o toda la energía de excitación se puede transferir desde el electrón fotoexcitado a un electrón de una molécula de pigmento adyacente, excitando el segundo electrón a un orbital de energía mayor. Este proceso llamado **transferencia de energía de resonancia**, es importante para transferir la energía captada desde las moléculas que absorben luz a las moléculas capaces de pasar un electrón excitado a una molécula orgánica aceptora. La transferencia del electrón fotoexcitado de un orbital de alta energía a otras moléculas se llama **reducción fotoquímica.** Esta transferencia, que pronto veremos, es imprescindible para convertir la energía luminosa en energía química.

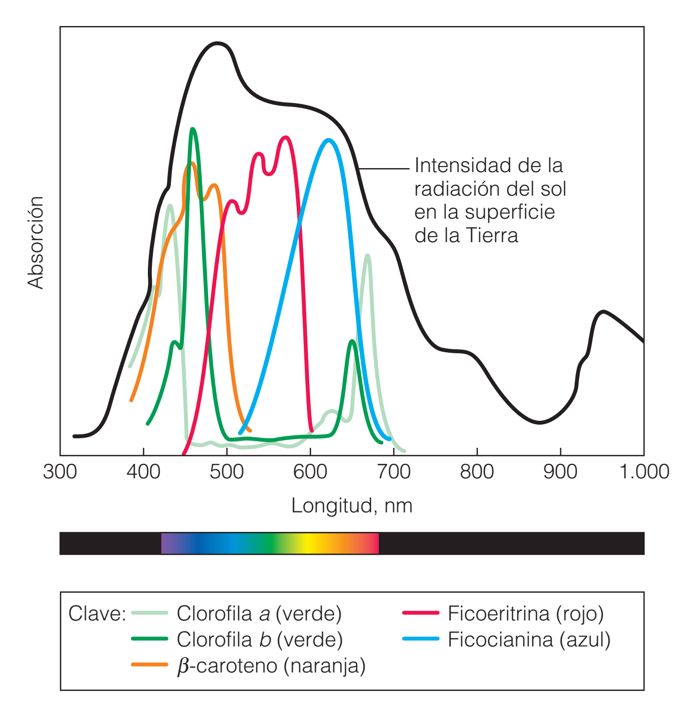


Figura 11.5 Espectro de absorción de los pigmentos de plantas comunes. El espectro de absorción de varios pigmentos se compara con la distribución espectral de la energía solar que alcanza la superficie terrestre. De hecho el espectro de absorción solapado de varias clorofilas y de los pigmentos accesorios cubre casi el espectro entero de la luz solar que alcanza la superficie de la tierra.

La clorofila es el vínculo primario de la vida con la luz del sol

La **clorofila**, la cual se encuentra en casi todos los organismo fotosintéticos, es el pigmento primario de transducción de la energía que canaliza la energía solar hacia la biosfera. En la Figura 11.6 se muestra la estructura de dos clases de clorofilas —clorofilas *a* y *b*—. La estructura de cada molécula consiste en un *anillo porfirínico* central y una cadena lateral *fitol* fuertemente hidrofóbica. Las dobles enlaces alternantes en el anillo porfirínico son responsables de la absorción de la luz visible, mientras que la cadena lateral fitol interacciona con los lípidos del tilacoide o con las membranas de las cianobacterias, anclando las moléculas absorbentes de luz a estas membranas.

El ion de magnesio (Mg^{2+}) presente en las clorofilas *a* y *b* afecta a la distribución de electrones en el anillo porfirínico y asegura que estén disponibles diversos orbitales de alta energía. Como resultado, se pueden absorber varias longitudes de onda específicas de la luz. La clorofila *a*, por ejem-

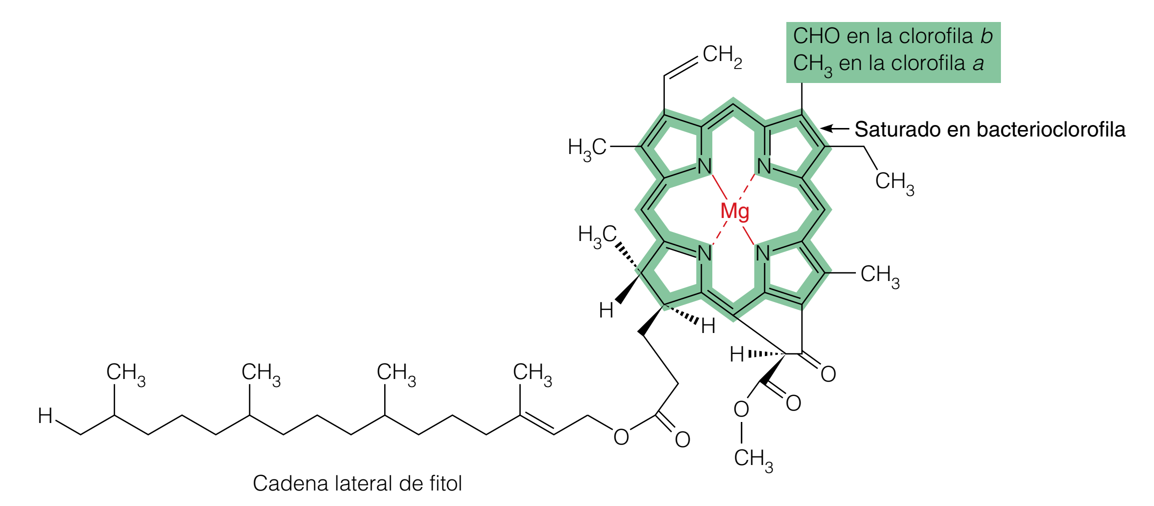


Figura 11.6. Estructura de las clorofilas *a* y *b*. El esqueleto de cada molécula de clorofila consiste de un anillo central porfirínico (resaltado) y una cadena lateral hidrofóbica llamada fitol. La clorofila *a* tiene un grupo metilo (—CH_3) en la posición indicada, mientras que la clorofila *b* tiene un grupo formilo (—CHO). La bacterioclorofila que se encuentra en los fotótrofos anoxigénicos tiene una unión carbono-carbono saturada en el lugar indicado por la flecha.

plo, tiene un espectro amplio de absorción, con máximos alrededor de 420 a 660 nm (*véase* Figura 11.5). La clorofila *b* se distingue de la clorofila a por la presencia de un grupo *formil* (—CHO) en lugar de los grupos metilo (—CH_3) en el anillo de porfirina. Esta mínima alteración estructural desplaza la absorción máxima hacia la región central del espectro visible (*véase* Figura 11.5).

Todas las plantas y las algas verdes contienen tanto clorofila *a* como *b*. Los espectros de absorción combinados de las dos formas de clorofila proporcionan acceso a un amplio rango de longitudes de onda de la luz solar y permiten a estos organismos recoger más fotones. Otros organismos fotosintéticos oxigénicos complementan la clorofila *a* con la clorofila *c* (algas pardas, diatomeas, y dinoflagelados), clorofila *d* (algas rojas), o con la ficobilina (cianobacterias).

La **bacterioclorofila** es un subfamilia de moléculas de clorofila restringidas a fotótrofos anoxigénicos (bacterias fotosintéticas) y se caracterizan por un sitio saturado que no se encuentra en otras moléculas de clorofila (indicado por una fecha en la Figura 11.6). En este caso, la alteración estructural desplaza los máximos de absorción de bacterioclorofilas hacia las regiones del ultravioleta cercano y del rojo lejano del espectro.

Los pigmentos accesorios incrementan el acceso a la energía solar

La mayoría de los organismos fotosintéticos también contienen **pigmentos accesorios**, los cuales absorben los fotones que no pueden ser capturados por la clorofila. Esta característica permite a los organismos absorber una porción mucho mayor de la energía de la luz solar que alcanza la superficie de la tierra, como se muestra en la Figura 11.5. Los dos tipos de pigmentos accesorios son los **carotenoides** y **las ficobilinas.** Los dos carotenoides que son abundantes en las membranas de los tilacoides de la mayoría de las plantas y de las algas verdes son el *β-caroteno* y *la luteína.* Estos pigmentos otorgan un matiz anaranjado o amarillo a las hojas, cuando abundan suficientemente y no se enmascaran por la clorofila. Los carotenoides absorben fotones en un amplio rango de la región azul del espectro, con máximos de absorción entre 420 y 480 nm.

Las ficobilinas se encuentran sólo en las algas rojas y cianobacterias. Los dos ejemplos comunes son la *ficoeritrina* y la *ficocianina.* La ficoeritrina absorbe fotones de las regiones azul, verde y amarillo del espectro, permitiendo a las algas rojas utilizar la luz tenue que penetra en el agua de la superficie del océano. La ficocianina, por otro lado, absorbe fotones de la región naranja del espectro y es característica de las cianobacterias que viven cerca de la superficie de los lagos o de la tierra. De esta manera, las variaciones de las cantidades y de las propiedades de pigmentos accesorios reflejan a menudo una adaptación de los fotótrofos a un medio ambiente específico.

Las moléculas que captan la luz se organizan en fotosistemas y complejos antena

Las moléculas de clorofila, los pigmentos accesorios y las proteínas asociadas se organizan en unidades funcionales llamadas **fotosistemas**, los cuales se localizan en los tilacoides o las membranas bacterianas fotosintéticas. Las moléculas de clorofila se anclan a las membranas por las largas cadenas laterales hidrofóbicas. **Las proteínas que se unen a la clorofila** estabilizan la disposición de la clorofila dentro de un fotosistema y modifican los espectros de absorción de las

moléculas de clorofila específicas; otras proteínas en los fotosistemas se unen a componentes del sistema de transporte de electrones o catalizan las reacciones oxidación-reducción.

La mayoría de los pigmentos de un fotosistema solamente sirven como **pigmentos antena** captadores de luz, absorbiendo fotones y pasando la energía a una molécula de clorofila vecina o a pigmentos accesorios mediante la transferencia de la energía resonante. Los acontecimientos fotoquímicos que conducen el flujo de electrones y el bombeo de protones no comienzan hasta que la energía alcanza **el centro reactivo** de un fotosistema, donde residen dos moléculas de clorofila a distintas conocidas como **par especial.** Este par de moléculas de clorofila, rodeado por otros componentes de este centro reactivo, catalizan la conversión de la energía solar en energía química.

Cada fotosistema generalmente se vincula con un **complejo recolector de luz** (**LHC**), el cual, como el fotosistema, recoge la energía de la luz. El LHC, sin embargo, no contiene el centro reactivo; en cambio, pasa la energía recogida a un fotosistema cercano mediante la transferencia de la energía resonante. Las plantas y las algas verdes tiene LHCs compuestos de aproximadamente de 80-250 moléculas de clorofila *a* y *b*, junto con los carotenoides y las proteínas unidas a los pigmentos. Las algas rojas y las cianobacterias tienen un tipo diferente de LHC, llamado **ficobilisoma**, el cual contiene ficobilinas más que clorofilas y carotenoides. Juntos, el fotosistema y el LHC asociado, se denominan el **complejo fotosistema.**

Los fotótrofos oxigénicos tienen dos tipos de fotosistemas

En 1940, Robert Emerson y sus colegas de la Universidad de Illinois descubrieron que dos fotorreacciones separadas están implicadas en la fotorreducción de los fotótrofos oxigénicos. Al principio, observaron en la fotosíntesis del alga verde *Clorela* una reducción espectacular del índice de la evolución del oxígeno en una longitud de onda por encima de 690 nm aproximadamente (Figura 11.7). El grupo de Emerson consideró extraña esta *bajada de color rojo* porque *Clorela* realmente contiene moléculas de clorofila que absorben una cantidad significativa de luz de longitud de onda por encima de los 690 nm. Cuando complementaron las longitudes de onda de la luz más largas con una longitud de onda más corta (alrededor de 650 nm) la bajada de color rojo era menos severa, como se muestra en la Figura 11.7. Efectivamente, la fotosíntesis producida por una combinación de longitudes de onda largas y cortas de luz roja sobrepasó la suma de las actividades generadas por cada longitud de onda por sí sola. Este fenómeno sinérgico comenzó a conocerse como el **efecto del aumento de Emerson.**

Ahora conocemos que el efecto del aumento de Emerson en los fotótrofos oxigénicos es el resultado del trabajo conjunto de dos fotosistemas distintos. El **fotosistema I** (**PSI**), con un máximo de absorción a 700 nm, absorbe longitudes de ondas largas y cortas de luz roja, mientras que el **fotosistema II** (**PSII**), con un máximo de absorción de 680 nm, únicamente absorbe longitudes de onda corta de luz roja. Cada electrón que pasa desde el agua a NAD^+ debe ser fotoexcitado dos veces, una por el PSI y otra por PSII. Cuando la iluminación se restringe a longitudes de onda superiores a 690 nm, PSII no se activa y la fotosíntesis se perjudica severamente. El par especial de moléculas de clorofila dentro de los centros reactivos de PSI y PSII se denominan, respectivamente, **P700** y **P680** para reflejar sus máximos específicos de absorción.

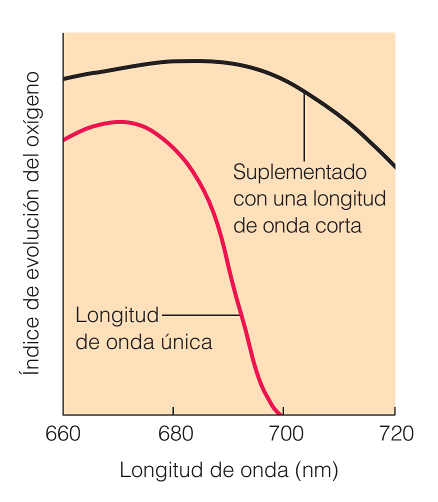


Figura 11.7 Efecto del aumento de Emerson. Cuando las células del alga verde *Clorela* se iluminan con luz de una única longitud de onda, hay una bajada espectacular en el espectro de actividad (medido por la evolución del oxígeno), por encima de una longitud de onda de alrededor de 690 nm. Esta bajada, de color rojo, es menos severa cuando la longitud de onda larga de la luz se suplementa con una longitud de onda corta (650 nm).

Fotorreducción (síntesis de NADPH) en los fotótrofos oxigénicos

En los fotótrofos oxigénicos, los dos fotosistemas distintos son imprescindibles aparentemente para la conservación eficaz de la energía en forma de electrones fotoexcitados, donados por el agua, que se transfieren a la **nicotinamida adenina dinucleótido fosfato** (**$NADP^+$**) para formar NADPH, la forma reducida de $NADP^+$. La vía completa de fotorreducción incluye varios componentes, como se muestra en la Figura 11.8. La absorción de la energía de la luz por cada fotosistema empuja electrones hacia «el nivel superior» de un ETS. Una parte de su energía, como el electrón fluye exergónicamente desde PSII a PSI, se conserva en forma de gradiente electroquímico de protones a través de la membrana del tilacoide (o membrana cianobacteriana). Los electrones pasan, desde PSI, a la *ferredoxina* (Fd) y luego a $NADP^+$, conservando el poder reductor en la forma de

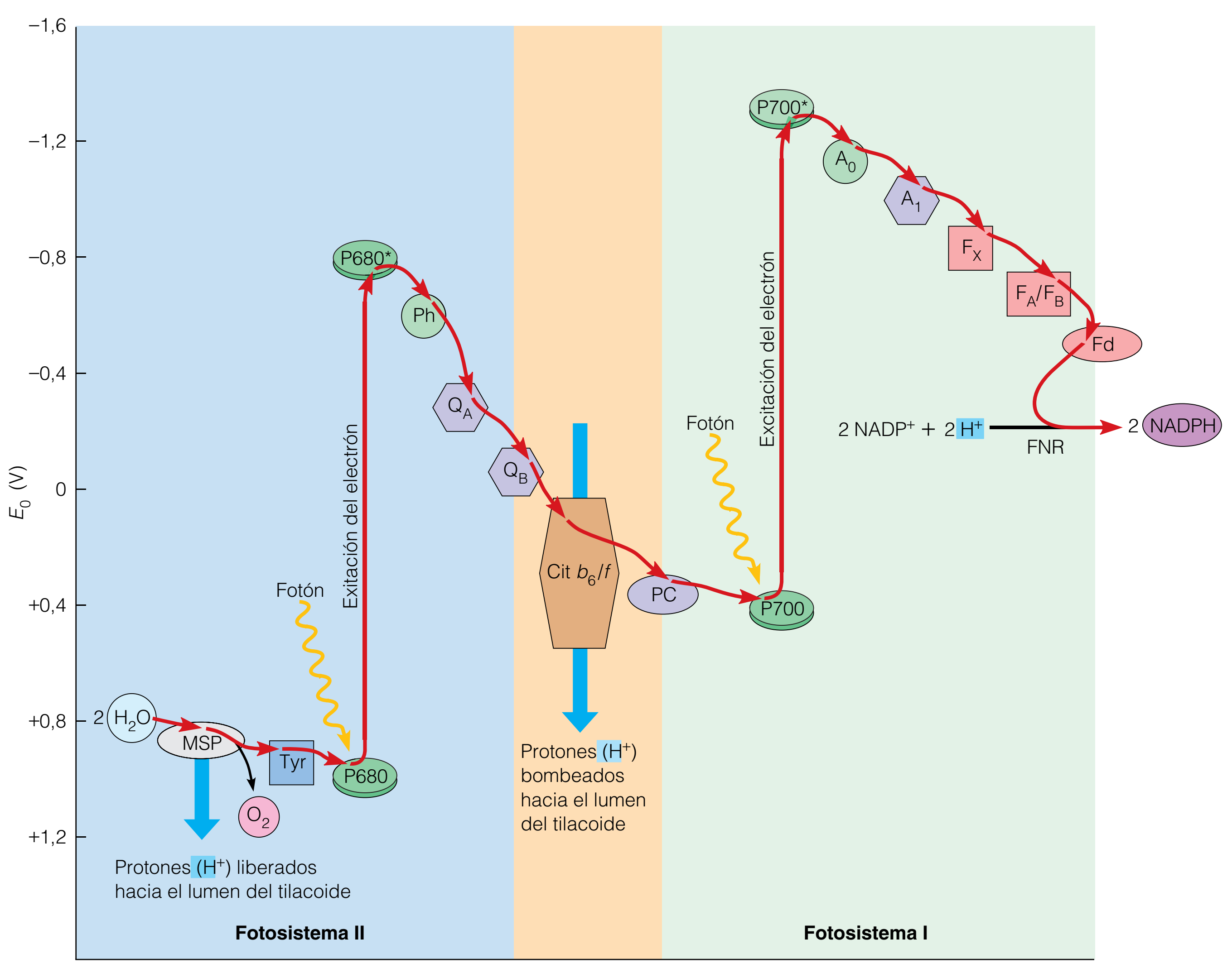


Figura 11.8 **Flujo de electrones en los fotótrofos oxigénicos.** Los componentes del sistema de transporte de electrones que son parte de PSII incluyen proteínas estabilizadoras con manganeso (MSP), una residuo de tirosina (Tyr) en la proteína D1 (*véase* Figura 11.9), un par especial de moléculas de clorofila *a* (P680), feofitina (Ph), y dos platoquinonas (Q_A y Q_B). Los componentes del PSI incluyen otro par especial de moléculas de clorofila a (P700), una molécula de clorofila a modificada (A_0), una filoquinona (A_1) y tres centros ferrosulfurados (F_X, F_A, y F_B). Los fotosistemas están unidos por un complejo citocromo b_6/f, en el cual el transportador de electrones se acopla (vía marcada en rojo) para el bombeo de los protones hacia el lumen del tilacoide, y por la platocianina (PC). El P680 y P700 son poco usuales ya que la absorción de fotones provoca una disminución importante en sus potenciales de reducción (eje vertical), permitiendo entonces que acepten electrones a partir un donador con un potencial de reducción muy positivo y donar electrones a un aceptor con un potencial de reducción muy negativo, conservando de ese modo la energía captada. La ferredoxina-NADP$^+$ reductasa (FNR) cataliza la transferencia de electrones desde la ferredoxina (Fd) a NADP$^+$. Vea la Figura 11.9 para un modelo que muestra la orientación de varios componentes descritos aquí dentro de una membrana del tilacoide.

NADPH. El NADP$^+$ sólo difiere de NAD$^+$ por tener un grupo fosfato adicional adjunto a su adenosina (*véase* Figura 9.5). El NADP$^+$ es la coenzima seleccionada para un gran número de vías anabólicas, mientras que NAD$^+$normalmente se involucra en las vías catabólicas.

El fotosistema II transfiere los electrones desde el agua a una plastoquinona

El recorrido detallado de la vía de la fotorreducción comienza en el fotosistema II, el cual debe usar los electrones del agua para reducir una plastoquinona a platoquinol. El centro reactivo de PSII, parte del cual se muestra en la Figura 11.9, incluye dos proteínas grandes, D1 y D2, que unen no sólo clorofila, sino también los componentes de un ETS. Alrededor del centro activo de PSII hay unas 40-50 clorofilas adicionales y alrededor de 10 moléculas de β-carotenos que aumentan la recogida de fotones.

La fotorreducción no depende de la absorción directa de un fotón en el centro reactivo de un fotosistema, o incluso por un pigmento cercano. En plantas y algas verdes, el PSII generalmente se asocia con el **complejo recolector de la**

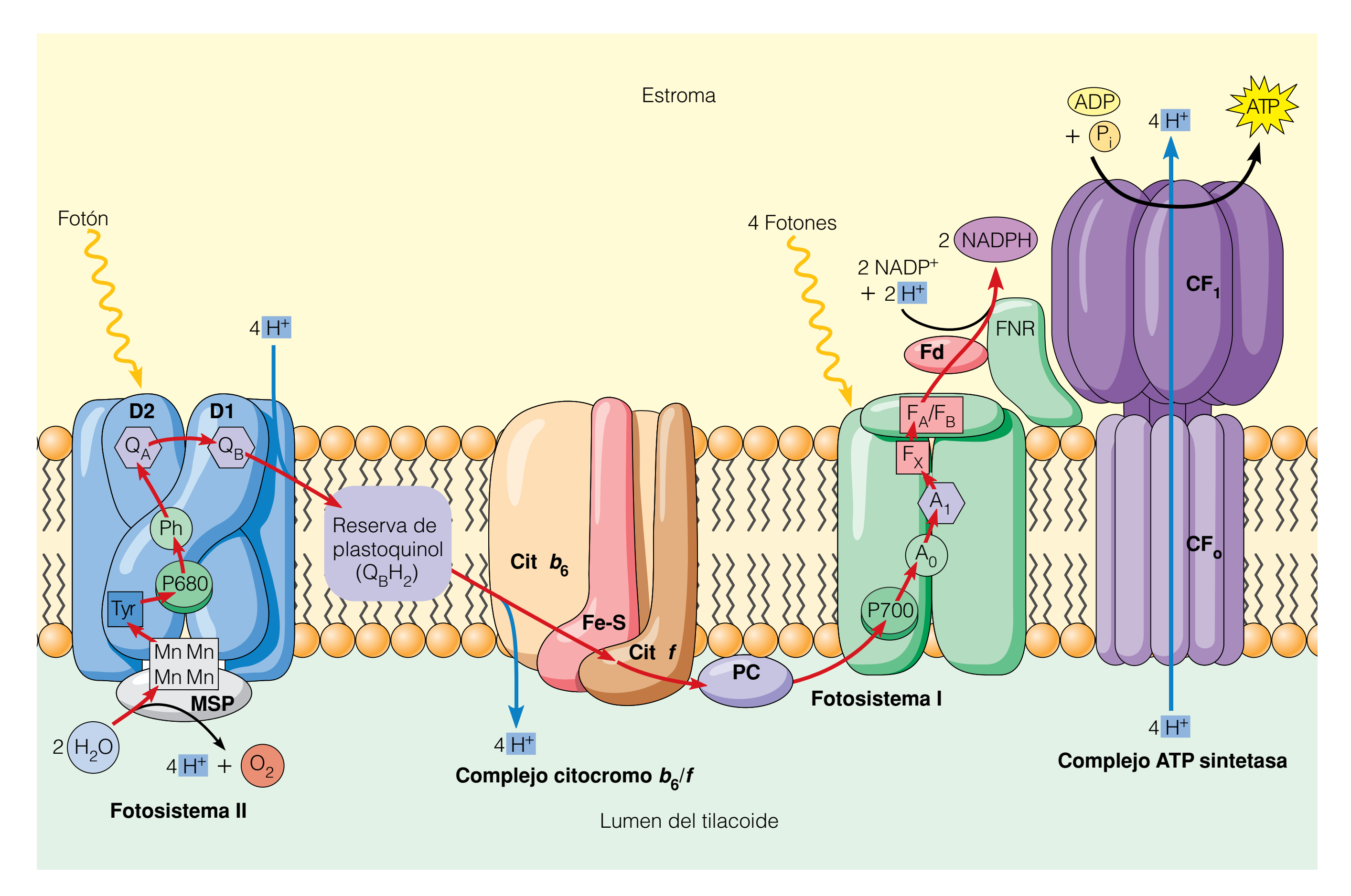


Figura 11.9 Modelo de la orientación de los principales complejos de la transducción de la energía dentro de la membrana tilacoidal. Este diagrama muestra la posible colocación de PSII, el complejo citocromo b_6/f, PSI, y el complejo ATP sintetasa dentro de la membrana del tilacoide. La vía indicada en rojo representa el flujo probable de electrones desde el agua a $NADP^+$. El PSII incluye al menos dos proteínas importantes, D1 y D2, que unen componentes del sistema de transporte de electrones. El grupo de los cuatro átomos de manganeso en la base de PSII es parte del complejo productor de oxígeno. El complejo citocromo b_6/f incluye dos citocromos (b_6 y f) y una proteína con ferrodulfurada. La estequiometría mostrada corresponde al paso de cuatro electrones desde el H_20 a NADPH. Vea la Figura 11.8 para la clave general de los símbolos.

luz (LHCII), el cual contiene alrededor de 250 moléculas de clorofilas y numerosas moléculas carotenoides. La energía captada por los pigmentos antenas del PSII, o de un LHCII asociado, se canalizan al centro reactivo mediante la transferencia de la energía resonante. Cuando la energía alcanza el centro reactivo, disminuye el potencial de reducción de un par de moléculas de clorofila *a*, designadas P680, alrededor de −0,80 V (*véase* Figura 11.8). Esto permite que un electrón fotoexcitado pase a la *feofitina* (*Ph*), una molécula de clorofila *a* modificada con dos protones en lugar del ion magnesio. La separación de carga entre el P680 oxidado y la feofitina reducida atrae a los electrones, evitando que regresen a su estado basal en el P680.

Después el electrón pasa a Q_A, una **plastoquinona,** que está unida fuertemente a la proteína D2 (*véase* Figura 11.9). La plastoquinona es semejante al *coenzima* Q, la cual es un componente del sistema de transporte de electrones mitocondria (*véase* Figura 10.13). Otra plastoquinona, Q_B, se une fuertemente a la proteína D1, pero sólo hasta que recibe, uno a uno, los dos electrones de Q_A. Q_B reducida capta dos protones del estroma y los introduce en grupo de **plastoquinol, Q_BH_2,** en la fase lipídica de la membrana fotosintética. Q_BH_2, el cual es un transportador móvil de electrones, puede transportar luego dos electrones y dos protones al *complejo citocromo b_6/f.*

La formación de una molécula de platoquinol móvil, debido a que por fotón absorbido una molécula de clorofila cataliza la transferencia de un único electrón, depende de dos fotorreacciones secuenciales en el mismo centro reactivo:

$$2 \text{ fotones} + Q_B + 2H^+_{\text{estroma}} + 2\,e^- \longrightarrow Q_BH_2 \quad \textbf{(11.3)}$$

El P680 oxidado, para absorber fotones repetidamente, se debe reducir cada vez que pierde un electrón hacia la plastoquinona. El PSII incluye un **complejo productor de oxígeno (OEC),** para volver a llenarse de electrones, un complejo de proteínas e iones manganeso que catalizan la oxidación

del agua a oxígeno molecular (O_2). Dos moléculas de agua donan cuatro electrones al P680 reducido, uno a uno, a través de una *tirosina* de la proteína D1 (*véanse* Figuras 11.8 y 11.9). En el proceso, cuatro protones y una molécula de oxígeno se liberan en el lumen del tilacoide. Los protones contribuyen al gradiente electroquímico de protones a través de la membrana y el oxígeno difunde fuera del cloroplasto (o cianobacteria). Debido a que la oxidación completa de dos moléculas de agua para liberar el oxígeno molecular depende de cuatro fotorreacciones, la reacción final catalizada por el PSII, que se pueden resumir de la siguiente manera:

$$4 \text{ fotones} + 2\, H_20 + 2\, Q_B + 4H^+_{estroma} \longrightarrow 4H^+_{lumen} + O_2 + 2\, Q_BH_2 \qquad \textbf{(11.4)}$$

Fíjese que los protones extraídos desde el estroma están realmente en tránsito al lumen todavía como parte de Q_BH, mientras que los protones añadidos al lumen derivan de la oxidación del agua. La oxidación del agua dependiente de la luz, para dar lugar protones y a oxígeno molecular, se denomina *fotolisis de agua*, y se cree que apareció en las cianobacterias hace 2 o 3 mil millones de años, permitiendo de ese modo la explotación del agua como donante de electrones. El oxígeno liberado en el proceso cambió drásticamente la atmósfera primitiva de la tierra, la cual en un principio no contenía oxígeno libre, y permitió el desarrollo de la respiración aerobia.

El complejo citocromo b_6/f transfiere los electrones desde el plastoquinol a la plastocianina

Antes de que los electrones transportados por Q_BH_2 se liberen a PSI para otro impulso de la energía, fluyen a través de un ETS unido a una bomba de protones unidireccional a través de la membrana del tilacoide hacia el lumen. Esto ocurre a través del **complejo citocromo b_6/f,** el cual es equivalente al *complejo respiratorio III* mitocondrial descrito en el Capítulo 10 (*véase* Figura 10.14). El complejo citocromo b_6/f se compone de cuatro proteínas integrales de membrana distintas, que incluyen dos citocromos y una proteína ferrosulfurada.

Q_BH_2 es hidrofóbica y difunde dentro de la fase lipídica de la membrana del tilacoide desde PSII al complejo citocromo b_6/f. Allí dona los dos electrones al *citocromo f*, de uno en uno, mediante *el citocromo b_6* y una proteína ferrosulfurada. La oxidación de Q_BH_2 libera dos protones hacia el lumen del tilacoide y permite a Q_B volver al grupo de plastoquinona disponible para aceptar electrones desde PSII.

El citocromo *f* dona los electrones a una proteína que contiene cobre llamada **plastocianina** (**PC**). La platocianina, como el plastoquinol, es un transportador móvil de electrones. A diferencia del plastoquinol, sin embargo, es una proteína de membrana periférica situada en el lado luminal de la membrana del tilacoide y transporta un único electrón cada vez. La reacción final catalizada por el complejo citocromo b_6/f, comenzando con dos moléculas de Q_BH_2 desde PSII (*véase* Reacción 11.4), se puede resumir como:

$$2Q_BH_2 + 4PC\,(Cu^{2+}) \longrightarrow 2Q_B + 4H^+_{lumen} + 4PC(Cu^{2+}) \qquad \textbf{(11.5)}$$

Así, las cuatro fotorreacciones en PSII añaden un total de los ocho protones al lumen del tilacoide: cuatro por la oxidación del agua a oxígeno molecular y cuatro transportados al lumen por las dos moléculas plastoquinol (Figura 11.9). Cada plastocianina reducida difunde ahora a un complejo PSI, donde puede donar un electrón a una molécula P700 oxidada.

El fotosistema I transfiere los electrones desde la plastocianina a la ferredoxina

La función del fotosistema I es transferir los electrones fotoexcitados desde la plastocianina reducida a una proteína conocida como *ferredoxina*. Como indica la Figura 11.9, el centro de reacción de PSI incluye una tercera molécula de clorofila *a*, llamada A_0, en vez de una molécula de feofitina. Otros componentes del centro de reacción incluyen una *filoquinona* (A_1) y tres *centros ferrosulfurados* (F_X, F_A, y F_B) que forman un ETS enlazando A_0 a la ferredoxina.

El PSI en plantas y algas verdes se asocia con el **complejo I recolector de luz (LHCI)**, el cual contiene menos moléculas antena que LCII —entre 80 y 120 moléculas de clorofilas y unas pocas moléculas de carotenoides—. Como en el complejo PSII, la energía captada por los pigmentos antenas en el fotosistema, o por un complejo recolector de luz asociado, se canaliza hacia un centro de reacción que contiene un par especial de moléculas de clorofila *a*. La energía que se absorbe por PSI disminuye el potencial de reducción de su par especial de clorofilas, llamados P700, a $-1{,}30$ V (*véase* Figura 11.8). Un electrón fotoexcitado entonces se transfiere rápidamente a A_0, y la separación de cargas entre el P700 oxidado y el A_0 reducido evita que el electrón regrese a su primer estado basal. Esta reacción de óxido-reducción y el análogo en PSII son las *fotorreacciones* verdaderas de la transducción de la energía fotosintética.

Los electrones, desde A_0, se mueven exergónicamente a través de ETS hacia la ferredoxina, el aceptor final de electrones para PSI. La **ferredoxina** (**Fd**) es una proteína móvil ferrosulfurada que se encuentra en el estroma del cloroplasto. La Fd, como veremos más adelante, es un importante reductor en distintas vías metabólicas, incluyendo la asimilación de nitrógeno y de sulfuro. Para transferir repetidamente electrones a la ferredoxina, el P700 oxidado, se debe reducir cada vez que pierde un electrón. El donante es la plastocianina reducida. La reacción neta catalizada por PSI, comenzando con cuatro moléculas de plastocianina reducidas generadas en el complejo citocromo b_6/f (Reacción 11.5), se puede resumir como:

$$4 \text{ fotones} + 4PC(Cu^+) + 4Fd(Fe^{3+}) \longrightarrow 4PpC(Cu^{2+}) + 4Fd\,(Fe^{2+}) \qquad \textbf{(11.6)}$$

La ferredoxina NADP$^+$ reductasa cataliza la reducción de NADP$^+$

El paso final en la vía de la fotorreducción es la transferencia de electrones desde la ferredoxina a NADP$^+$, produciendo de ese modo el NADPH imprescindible para la asimilación del carbono fotosintético. Esta transferencia se cataliza por la enzima **ferredoxina-NADP$^+$ reductasa (FNR),** una proteína periférica de membrana que se encuentra en el lado orientado hacia el estroma de la membrana tilacoidal. Comenzando con cuatro moléculas de ferredoxina reducidas generadas por el PSI (*véase* Reacción 11.6), se obtiene lo siguiente:

$$4\ Fd(Fe^{2+}) + 2NADP^+ + 2H^+_{estroma} \longrightarrow 4Fd\ (Fe^{3+}) + 2NADPH \qquad \textbf{(11.7)}$$

Fíjese en que la reducción de una molécula de NADP$^+$ consume un H$^+$ procedente del estroma más dos electrones que proceden cada uno de una ferredoxina reducida. Esta reacción, aunque realmente no se mueven los protones desde el estroma al lumen, aumenta el pH del estroma y contribuye al gradiente electroquímico de protones a través de la membrana del tilacoide.

Varios componentes del ETS, funcionando juntos dentro del cloroplasto, proporcionan un flujo unidireccional y continuo de electrones desde el agua a NADP$^+$, como se indica en las Figuras 11.8 y 11.9. Esto se denomina como **flujo no cíclico de electrones**, para distinguirlo del *flujo cíclico de electrones* que estudiaremos dentro de poco. El resultado neto de la oxidación completa, dependiente de la luz, de dos moléculas de agua a oxígeno molecular se puede obtener mediante la suma de las Reacciones 11.4 y 11.7, suponiendo que la ferredoxina no dona electrones a otras vías:

$$4 \text{ fotones de PSII} + 4 \text{ fotones de PSI} + 2H_20 + 6H^+_{estroma} + 2NADP^+ \longrightarrow 8H^+_{lumen} + 0_2 + 2NADPH \qquad \textbf{(11.8)}$$

Por cada ocho fotones absorbidos se generan dos moléculas de NADPH. Además, el ETS para la fotorreducción está acoplado a un mecanismo unidireccional de bombeo de protones a través de la membrana del tilacoide desde el estroma al lumen. De esta forma, la energía solar captada se almacena de dos formas: como NADPH reducido y como gradiente electroquímico de protones.

La fotofosforilación (síntesis de ATP) en fotótrofos oxigénicos

Debido a que la membrana del tilacoide es prácticamente impermeable a los protones, en los cloroplastos iluminados se puede producir un considerable gradiente electroquímico de protones a través de la membrana. Como se describió en el Capítulo 10 para la mitocondría, podemos calcular la fuerza total motriz del protón (pmf) a través de la membrana del tilacoide, sumando la concentración de protones (pH) y el potencial de membrana (V_m) (*véase* Ecuación 10.13). Esto representa el equivalente de la variación de la energía libre, ($\Delta G'$), para el movimiento de protones desde el lumen hacia el estroma.

La diferencia de pH (ΔpH) a través de la membrana interna en la mitocondria, es aproximadamente sólo de 1 unidad, contribuyendo alrededor de 0,06 V del total de pmf, mientras que la diferencia del potencial de membrana contribuye aproximadamente 0,16 V (*véase* Ecuación 10.14). En los cloroplastos, sin embargo, la contribución de ΔpH es más importante que la de ΔV_m. Aunque anteriormente se pensaba que el bombeo de protones hacia el lumen del tilacoide inducido por la luz causaba una disminución de su pH hasta un nivel de 4 o 5, investigaciones actuales muestran que la acidificación del lumen es menos acusada, disminuyendo sólo hasta niveles de pH entre 5,8 y 6,0. Unido al incremento de pH del estroma hasta pH 8 causado por el agotamiento de protones, esto crea un ΔpH de aproximadamente de 2 unidades, lo que es suficiente para generar un pmf de aproximadamente 0,12 V a 25 °C. Asumiendo esta estimación de la diferencia de potencial de membrana de aproximadamente 0,30 V, esto produce un pmf total de 0,15 V, lo que representa un $\Delta G'$ de aproximadamente de 3,5 Kcal/mol para los protones que se mueven a través de la membrana del tilacoide.

El complejo ATP sintetasa se une al transportador de protones a través de la membrana del tilacoide para sintetizar ATP

En los cloroplastos como en las mitocondrias, el movimiento de protones desde un compartimiento ácido a un compartimiento básico conduce la síntesis de ATP a través de un complejo **ATP sintetasa**. El complejo ATP sintetasa que se encuentra en los cloroplastos, denominado **complejo CF_0CF_1**, es extraordinariamente semejante al complejo F_0F_1 de la mitocondria descrito en el Capítulo 10 (*véase* Figura 10.18). El componente **CF_1** es un conjunto de polipéptidos hidrofóbicos que sobresalen hacia la cara del estroma de la membrana del tilacoide y contiene el sitio catalítico para la síntesis de ATP. CF_1, como la F_1 mitocondrial, y su tallo, se compone de cinco polipéptidos distintos con una estequiometría de $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$.

El componente **CF_0**, la otra mitad del complejo ATP sintetasa, es un conjunto de polipéptidos que se incrustan en la membrana del tilacoide, donde forman un canal hidrofóbico entre el lumen y el estroma. CF_0 es el **translocador de protones** a través del cual los protones se mueven bajo la presión del pmf. Este movimiento se une a la síntesis de ATP por el componente CF_1 como se ha descrito en el Capítulo 10 para la síntesis de ATP mitocondrial (*véase* Figura 10.19). En el pasado, se creía que por cada tres pro-

tones que pasaban a través del complejo CF_0CF_1 se sintetizaba un ATP; sin embargo, modelos actuales sugieren que se trasladan hasta cuatro protones para cada ATP sintetizado. Por lo tanto, la reacción catalizada por el complejo ATP sintetasa se puede resumir como:

$$4H^+_{lumen} + ADP + P_i \longrightarrow 4H^+_{estroma} + ADP \quad \textbf{(11.9)}$$

Esto es bastante razonable en términos de termodinámica. El valor $\Delta G'$ para la síntesis de ATP dentro del estroma del cloroplasto normalmente es 10-14 Kcal/mol, mientras que la energía disponible es alrededor de 14 Kilocalorías por cada 4 moles de protones que pasan a través del complejo ATP sintetasa (3,5 Kcal/mol $\times$ 4 moles = 14 Kcal/mol). De esa manera, el flujo de cuatro electrones a través de la vía no cíclica que se muestra en las Figuras 11.8 y 11.9 no sólo genera dos moléculas de NADPH, sino también conduce indirectamente a la formación de dos moléculas de ATP a partir de ADP y P_i (4 electrones $\times$ 2 protones/electrón $\times$ 1 ATP/4 protones = 2 moléculas de ATP).

Recuerde del Capítulo 6, que las enzimas únicamente cambian el ritmo a la cual se alcanza el equilibrio de los reactivos y los productos de una reacción química; no tienen efecto sobre la *posición* del equilibrio. La variación de la energía libre final, dentro de un cloroplasto iluminado, favorece la síntesis de ATP. Pero, ¿qué ocurre en la oscuridad, cuando el gradiente de protones inducido por la luz ya no se mantiene? Si el complejo CF_0CF_1 continúa activo podría transformarse en una *ATPasa,* consumiendo ATP al transportando activamente protones hacia el lumen. No es sorprendente que los cloroplastos tengan sistemas para regular la ATP sintasa para evitar el consumo innecesario de ATP se evite.

En la oscuridad, el deterioro del gradiente de protones inducido por la luz a través de la membrana del tilacoide reduce sustancialmente la actividad enzimática, pero no de manera sencilla ya que no hay protones disponibles para el transporte desde el lumen tilacoidal al estroma. Cuando la concentración de protones en el lumen disminuye, las actividades, tanto de síntesis de ATP y como de la hidrólisis de ATP se reducen. Un segundo mecanismo, que será descrito más adelante, une la activación de la síntesis de ATP en el cloroplasto con la presencia de ferredoxina reducida en el estroma. En ausencia de la fotorreducción, no hay bastante ferredoxina para mantener la síntesis de ATP en estado activo.

La fotofosforilación cíclica permite a una célula fotosintética equilibrar la síntesis de NADPH y ATP para cubrir sus necesidades precisas de energía

Estamos acercándonos al final de nuestra discusión sobre las reacciones de la transducción de la energía fotosintética, habiendo visto cómo se genera NADPH y ATP mediante el flujo de electrones conducidos por la luz. Pero antes de seguir hacia adelante con la asimilación del carbono, debemos considerar cómo los fotótrofos pueden equilibrar la síntesis de NADPH y ATP para producir la energía precisa y necesaria para una célula viva. Fíjese que el flujo no cíclico de electrones conduce a la generación de dos ATP por cada dos moléculas de NADPH. Ya que tanto el ATP como el NADPH se consumen por diversas vías metabólicas es muy poco probable que una célula fotosintética pueda siempre demandar ambas moléculas en la misma proporción en la que se generan por el flujo no cíclico de electrones. Generalmente, las células necesitan más ATP que NADPH.

Cuando el consumo de NADPH es bajo una vía optativa puede desviar el poder reductor generado en PSI hacia la síntesis de ATP más que a la reducción de $NADP^+$ a través de un proceso conocido como **flujo cíclico de electrones**. Como se muestra en la Figura 11.10, la ferredoxina reducida generada por el PSI puede pasar electrones hacia el complejo citocromo b_6/f en vez de donarlos hacia el $NADP^+$. El flujo exergónico de electrones desde la ferredoxina reducida a la plastocianina está acoplado al bombeo de protones, contribuyendo de ese modo al pmf a través de la membrana tilacoidal. Aunque el número exacto se desconoce, al menos se mueven tres protones desde el estroma hacia el lumen por cada 2 electrones. Los electrones regresan desde la plastocianina a una molécula P700 oxidada en el PSI, completando un circuito cerrado y permitiendo a P700 absorber otro fotón. El exceso de ATP que resulta de este flujo de electrones cíclico se llama *ciclo de fotofosforilación.* Ya que no está implicado el flujo de electrones desde PSII, no se oxida agua ni se libera oxígeno.

El sistema completo de transducción de energía

El modelo que se muestra en la Figura 11.9 representa el sistema de transducción de la energía fotosintética total dentro de una membrana tilacoide. Las características esenciales del sistema completo para la transferencia de electrones desde el agua a $NADP^+$ y la síntesis resultante de ATP se pueden resumir en los términos de los apartados siguientes:

1. *El complejo fotosistema II:* un conjunto de moléculas de clorofila, pigmentos accesorios y proteínas, con un potencial de reducción suficientemente positivo para permitir a una clorofila del centro de reacción P680 aceptar electrones exergónicamente desde el agua. El PSII, fotoexcitado desde aproximadamente + 0,9 a −0,8 V por un único fotón, tiene un potencial de reducción suficientemente negativo para donar electrones hacia la plastoquinona, reduciéndola a plastoquinol, un transportador móvil de electrones.
2. *El complejo Citocromo b_6/f:* un sistema de transporte de electrones que une plastoquinol con plastoquinona, y de ese modo une el PSII con PSI. El flujo de electrones hacia el complejo citocromo b_6/f se acopla a

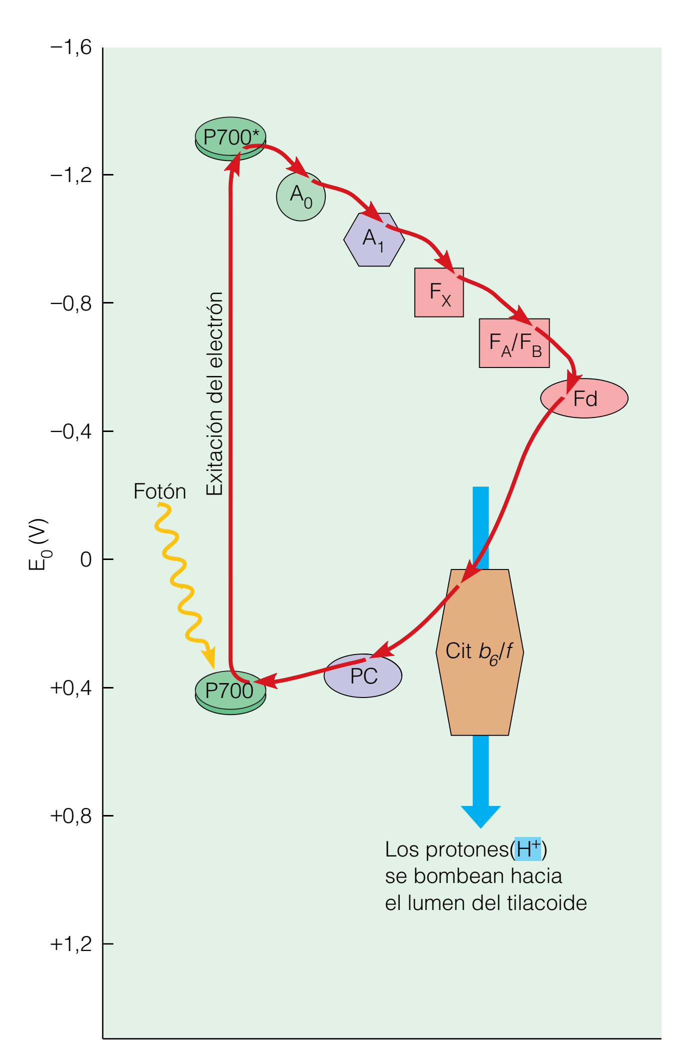


Figura 11.10 Flujo cíclico de electrones. El flujo cíclico de electrones a través de PSI permite a los fotótrofos oxigénicos aumentar la proporción de la producción de ATP/NADPH dentro de las células fotosintéticas. Cuando la concentración de $NADP^+$ es baja (esto es, cuando la concentración de NADPH es alta), la ferredoxina (Fd) dona los electrones hacia el complejo citocromo b_6/f. Entonces los electrones regresan a P700 mediante la plastocianina (PC). Ya que este flujo cíclico de electrones está acoplado al bombeo unidireccional de protones a través de la membrana del tilacoide el exceso de poder reductor está canalizado hacia la síntesis de ATP. Vea la Figura 11.8 para la clave general de los símbolos.

una bomba de protones unidireccional a través de la membrana tilacoidal, estableciendo y manteniendo un gradiente electroquímico de protones. Una opción al flujo cíclico de electrones permite al complejo citocromo b_6/f aceptar electrones desde la ferredoxina así como desde el plastoquinol, posibilitando la generación de ATP adicional cuando es necesaria.

3. *El complejo Fotosistema I*: un segundo conjunto de moléculas de clorofilas, pigmentos accesorios y proteínas, con un potencial de reducción suficientemente positivo para permitir a una clorofila del centro de reacción aceptar electrones exergónicamente desde la plastocianina. El PSI, fotoexcitado desde aproximadamente + 0,48 a −1,3 V por un único fotón, tiene un potencial de reducción suficientemente negativo para donar electrones a la proteína estromal ferredoxina.
4. *Ferredoxina-NADP$^+$ reductasa:* una enzima en el lado estromal de la membrana tilacoidal que cataliza la transferencia de electrones desde dos proteínas ferredoxina reducidas junto con un protón, a una única molécula de $NADP^+$. El NADPH generado en esta vía es un agente reductor imprescindible en muchas vías anabólicas, especialmente en la asimilación del carbono.
5. *El complejo ATP sintetasa (CF_0CF_1):* un canal de protones y una ATPsintetasa que acopla el flujo exergónico de protones (desde el lumen tilacoidal al estroma) a la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i. El ATP, como el NADPH, se acumula en el estroma, donde proporciona la energía para la asimilación del carbono.

Dentro de un cloroplasto operan tanto el flujo cíclico como el flujo no cíclico de electrones, lo que confiere flexibilidad en la cantidad relativa de ATP y NADPH que se genera. El ATP se puede producir casi en cantidades equimolares respecto al NADPH si únicamente opera la vía no cíclica, o se puede generar en las cantidades en exceso deseadas usando simplemente la vía cíclica del PSI que desvía electrones de la ferredoxina a P700 en lugar que al $NADP^+$.

El centro de reacción fotosintético de un bacteria púrpura

La mayor parte de nuestro conocimiento sobre el centro de reacción fotosintético y la química de la captación de la energía de la luz procede de los estudios de los complejos de los centros de reacción aislados a partir de bacterias fotosintéticas. A finales de 1960, Roberick Clayton y sus colaboradores purificaron con éxito el complejo del centro de reacción de una bacteria púrpura, *Rhodopseudomonas sphaeroides* (ahora denominada *Rhodobacter Sphaeroides*). Más recientemente, Hartmut Michel, Johann Deisenhofer, y Robert Huber cristalizaron un complejo del centro de reacción a partir de una bacteria púrpura diferente, *Rhodopseudomonas viridis* (ahora nombrada como *Blastochloris viridis*), y determinaron su estructura molecular mediante la cristalografía de rayos X. Michel y sus colegas no sólo proporcionaron la primera descripción detallada de cómo se organizan las moléculas de pigmento para capturar la energía de la luz, sino que también fue el primer grupo que consiguió cristalizar un complejo de proteínas de membrana. Michel, Deisenhofer y Huber recibieron el Premio Nobel en 1988, por sus contribuciones apasionantes e innovadoras.

El centro de reacción de *R. viridis*, como se muestra en la Figura 11.11, incluye cuatro subunidades de proteínas. La primer subunidad es una molécula de citocromo c unida a la superficie exterior de la membrana bacteriana. Las segunda y tercera subunidades, llamadas L y M, cruzan la membrana y estabilizan un total de cuatro moléculas de bacterioclorofila *b*, dos moléculas de bacteriofeofitina y dos quinonas. Las subunidades L y M son homólogas a las proteínas D1 y D2, respectivamente, del PSII de los fotótrofos oxigénicos (*véase* Figura 11.9). La subunidad cuarta, llamada H, se une a la superficie citoplasmática de la membrana y es homóloga a una proteína de PSII llamada CP43. El flujo de electrones a través de este fotosistema bacteriano y un segundo complejo de proteínas de membrana, *el complejo citocromo* b/c_1, se parece al flujo de electrones a través del PSII y del complejo citocromo b_6/f de los fotótrofos oxigénicos, pero con una diferencia importante: el fotosistema bacteriano no incluye un complejo generador de oxígeno.



Figura 11.11 Modelo de centro de reacción fotosintético de una bacteria púrpura. La estructura del centro de reacción de *Rhodopseudomonas viridis* se deduce a partir de las medidas de difracción por rayos X. El citocromo (azul-verde) con cuatro grupos hemo (amarillo) se sujeta a la superficie exterior de la membrana plasmática bacteriana. Las subunidades L y M cruzan la membrana y se unen a los componentes de los complejos recolector de luz y de la transferencia de electrones. La subunidad H generalmente permanece en el lado citoplasmático de la membrana.

Dos de las moléculas de bacterioclorofila *b* denominadas P960, para indicar su máxima absorción a 960 nm, tienen un papel directo en catalizar la transferencia dependiente de la luz de un electrón a un ETS. La absorción de un fotón, ya sea directamente o mediante los pigmentos accesorios, disminuye el potencial de reducción de P960 desde aproximadamente + 0,5 a −0,7 V. El electrón fotoexcitado se transfiere inmediatamente a la bacteriofeofitina, de ese modo se estabiliza la separación de cargas. El electrón, desde la bacteriofeofitina, fluye exergónicamente a través de dos quinonas y un complejo citocromo b/c_1 al citocromo *c*. Este flujo de electrones está acoplado a una bomba unidireccional de protones a través de la membrana bacteriana. Entonces el citocromo c devuelve el electrón hacia el P960 oxidado. El gradiente electrónico de protones a través de la membrana, como en los cloroplastos y en la mitocondria, conduce la síntesis de ATP mediante un complejo CF_0CF_1.

Fíjese que el flujo de electrones recientemente descrito es cíclico, sin ganancia neta de poder reductor. ¿Cómo genera reductores entonces la célula? Los complejos citocromo b/c_1 y el citocromo *c*, en *R. viridis*, aceptan electrones desde donantes como el sulfuro de hidrógeno, el tiosulfato o el succinato. El ATP generado mediante la fotofosforilación cíclica entonces se usa para empujar electrones en contra de gradiente energético desde el complejo citocromo b/c_1 o el citocromo *c* hasta NAD^+. El flujo cíclico de electrones descrito más arriba es muy diferente del flujo cíclico a través de PSI en los fotótrofos oxigénicos. Entonces, el fotosistema bacteriano se puede describir más correctamente como una versión un tanto simplificada del PSII de las plantas, de las algas verdes y de las cianobacterias.

La asimilación fotosintética del carbono: el ciclo de Calvin

Teniendo en mente la información de la estructura del cloroplasto y la transducción de la energía fotosintética, estamos ahora preparados para mirar con atención los acontecimientos principales de la asimilación del carbono. Atenderemos, más específicamente, a los primeros eventos de la asimilación del carbono: la fijación inicial y la reducción del dióxido de carbono a una forma simple de carbohidrato con tres carbonos. La vía fundamental para el movimiento del carbono inorgánico hacia la biosfera es el **ciclo de Calvin,** el cual se encuentra en todos los fotótrofos oxigénicos y en la mayoría de los fotótrofos anoxigénicos.

Esta vía se nombró en honor a Melvin Calvin, quien recibió el Premio Nobel en 1961 por el trabajo que él y sus colegas Andrew Benson y James Bassham hicieron para dilucidar el proceso. Aprovechando la disponibilidad de los isótopos radiactivos después de la Segunda Guerra Mundial, fueron capaces de usar el $^{14}CO_2$ para mostrar que los productos principales de la fijación del carbono fotosintético eran las triosas fosfato. Estas triosas fosfato, como ante-

riormente se mencionó, entran en diversas vías metabólicas, de las que las más importantes son la biosíntesis de sacarosa y almidón.

El ciclo de Calvin, en las plantas y en las algas, se restringe al estroma del cloroplasto, donde se acumula el ATP y el NADPH generado por las reacciones de transducción de la energía fotosintética. El dióxido de carbono, en las plantas, normalmente entra a la hoja a través de unos poros especiales llamados **estomas** (en singular: estoma). Las moléculas de dióxido de carbono, una vez dentro de la hoja, difunden hacia las **células mesófilas** y, en la mayoría de las especies de plantas, viajan libremente hacia el estroma del cloroplasto, el sitio de la fijación del carbono.

Por conveniencia; dividiremos el ciclo de Calvin en tres fases (Figura 11.12):

1. La carboxilación de la molécula orgánica aceptora la *ribulosa-1,5-bifosfato* y su hidrólisis inmediata para generar dos moléculas de *3-fosfoglicerato.*
2. La reducción de 3-fosfoglicerato para formar la triosa fosfato *gliceraldehído-3-fosfato.*
3. La regeneración de la molécula aceptora inicial para permitir la asimilación continua del carbono.

Recuerde cuando se observe cada fase individualmente, que son partes integrales de la vía completa que se muestra en la Figura 11.12 y que los tres procesos ocurren simultáneamente en los cloroplastos iluminados.

El dióxido de carbono entra en el ciclo de Calvin mediante la carboxilación de la ribulosa-1,5-bifosfato

La primera fase del ciclo de Calvin comienza con la unión covalente del dióxido de carbono al carbono del grupo carbonilo de la ribulosa-1,5-bifosfato (Reacción CC-1 en la Figura 11.12.) La carboxilación de esta molécula aceptora de cinco carbonos puede generar un producto de seis carbonos, pero nadie ha aislado tal molécula. Como Calvin y sus colegas mostraron, el primer producto detectable de la fijación del dióxido de carbono mediante esta vía es una molécula de tres carbonos, la 3-fosfoglicerato. Se supone que, el compuesto de seis carbonos existe sólo como un intermediario transitorio unido a una enzima, el cual se hidroliza inmediatamente para generar dos moléculas de 3-fosfoglicerato:

$$\underset{\text{Ribulosa-1,5-bifosfato}}{CH_2O\text{-}P\text{-}C{=}O\text{-}CHOH\text{-}CHOH\text{-}CH_2O\text{-}P} \xrightarrow{CO_2 \quad H^+} \underset{\text{Intermedio unido a la enzima}}{CH_2O\text{-}P\text{-}C(COO^-)(OH)\text{-}C{=}O\text{-}CHOH\text{-}CH_2O\text{-}P} \xrightarrow{H_2O \quad H^+} \underset{\text{Dos moléculas de 3-fosfoglicerato}}{CH_2O\text{-}P\text{-}CHOH\text{-}COO^- + {}^-OOC\text{-}CHOH\text{-}CH_2O\text{-}P} \quad \textbf{(11-10)}$$

El dióxido de carbono recientemente fijado aparece en el grupo carboxilo de una de las dos moléculas de 3-fosfoglicerato.

La enzima que cataliza la captura del dióxido de carbono y la formación de 3-fosfoglicerato se llama **ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (rubisco)**. Esta enzima relativamente grande (aproximadamente 560 KDa) es única para los fotótrofos y se encuentra en todos los organismos fotosintéticos excepto en algunas bacterias fotosintéticas. Teniendo en cuenta su papel imprescindible en la fijación del dióxido de carbono para prácticamente toda la biosfera, resulta poco sorprendente que la rubisco se considere la proteína más abundante en el planeta. Aproximadamente del 10-25% de las proteínas solubles de la hoja son rubisco, y una valoración de la cantidad de rubisco en la tierra cifra en 40 millones de toneladas, o casi 15 lb (aproximadamente 7 kg) por cada persona viva. Después de estudiar la siguientes dos fase del ciclo de Calvin volveremos a la rubisco y consideraremos la regulación de la actividad *carboxilasa* de la enzima, así como los problemas creados por su actividad *oxigenasa.*

El 3-fosfoglicerato se reduce para formar gliceraldehído-3-fosfato

Las moléculas de 3-fosfoglicerato formadas durante la fijación del dióxido de carbono, se reducen a gliceraldehído-3-fosfato (G-3-P) en la fase segunda del ciclo de Calvin. Esto implica una secuencia de reacciones que es esencialmente inversa a la secuencia oxidativa de la glicolisis (reacciones Gly-6 y Gly-7 en la Figura 9.6), excepto que la coenzima implicada es NADPH y no NADH. Los pasos para la reducción mediada por NADPH se muestran en la Figura 11.12 como las reacciones CC-2 y CC-3. En la primera reacción, la *fosfogliceroquinasa* cataliza la transferencia de un grupo fosfato desde el ATP al 3-fosfoglicerato. Esta reacción genera un intermediario activado, el glicerato-1,3-difosfato. En la segunda reacción, la *gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa* cataliza la transferencia de dos electrones desde el NADPH a glicerato-1,3-bifosfato, reduciéndolo a gliceraldehído-3-fosfato.

En este punto son necesarias algunas cuentas. Por cada molécula de dióxido de carbono que se fija por la rubisco (reacción CC-1) se generan dos moléculas de 3-fosfoglice-

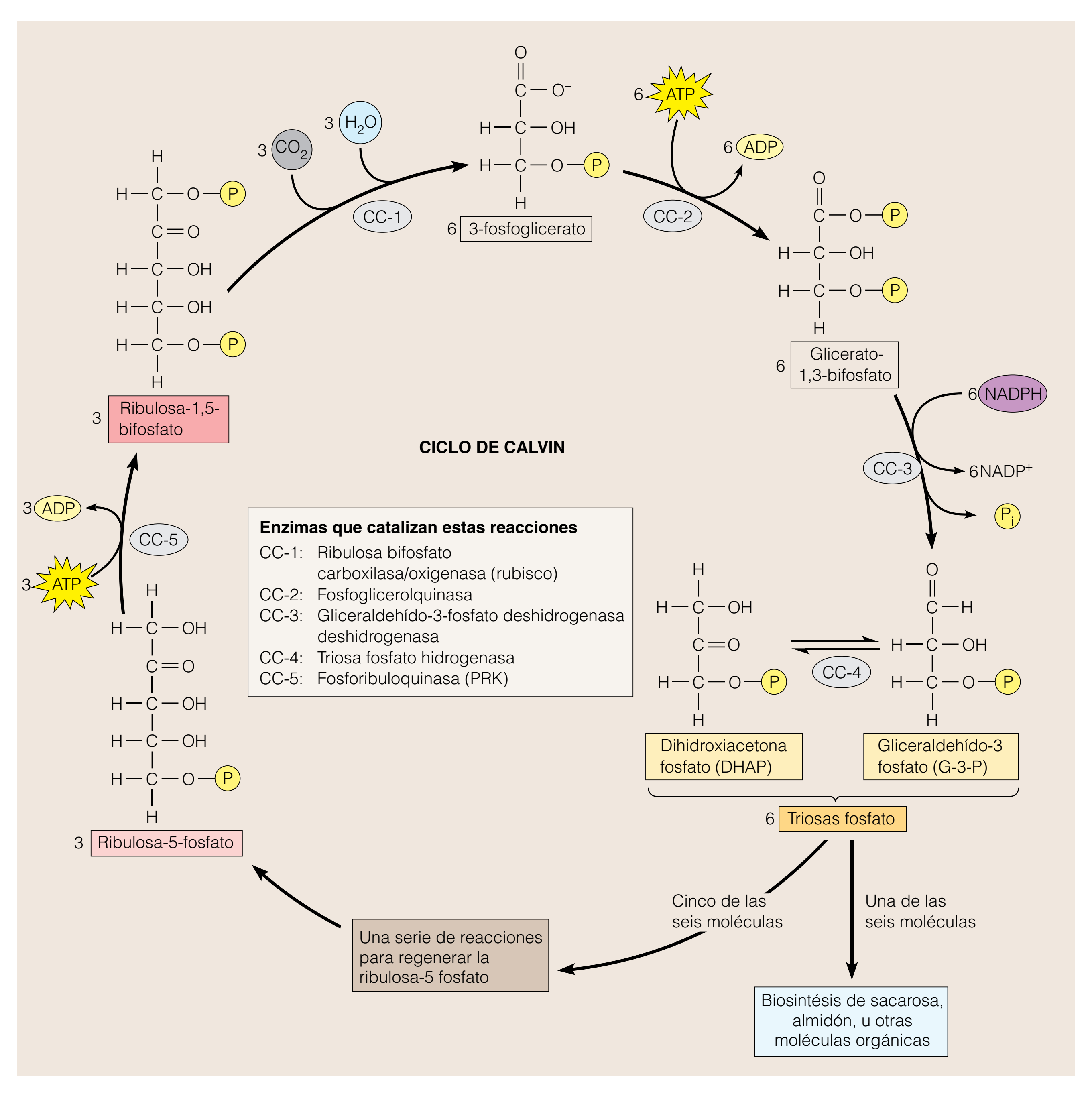


Figura 11.12 **El ciclo de Calvin para la asimilación del carbono fotosintético.** La estequiometría que se muestra corresponde a la síntesis neta de una molécula de triosa fosfato. Las reacciones CC-1, CC-2 y CC-3 proporcionan la fijación inicial y la reducción del dióxido de carbono, generando las triosas interconvertibles gliceraldehído-3-fosfato (G-3-P) y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) formadas por la reacción CC-4. Por término medio, una de cada seis moléculas de triosas fosfato —el producto del ciclo de Calvin— se usa para la biosíntesis de sacarosa, almidón u otras moléculas orgánicas. Cinco de cada seis moléculas de triosas fosfato se deben usar para forman tres moléculas de ribulosa-5-fosfato. De esa manera la ribulosa-5-fosfato se fosforila a expensas de un ATP en la reacción CC-5 para regenerar la molécula aceptora de la reacción CC-1, de esta manera se completa una vuelta del ciclo.

rato. La reducción de ambas de esas moléculas a G-3-P requiere la hidrólisis de dos moléculas de ATP y la oxidación de dos moléculas de NADPH, todo ello para una ganancia final de un único átomo de carbono. La síntesis final de una molécula de triosa fosfato requiere la fijación y la reducción de *tres* moléculas de dióxido de carbono para mantener el equilibrio del carbono y, por tanto, consumir seis ATP y seis NADPH:

$$\begin{aligned} &3 \text{ ribulosa-1,5-bifosfato} + 3CO_2 + \\ &\quad + 3H_2O + 6ATP + 6NADPH \longrightarrow \\ &\quad 6G\text{-}3\text{-}P + 6ADP + 6\,P_i + 6NADP^+ \end{aligned} \quad \textbf{(11.11)}$$

El gliceraldehído-3-fosfato producido por las reacciones CC-1 a CC-3 entra en un fondo interconvertible de G-3-P y dihidroxiacetona fosfato (DHAP). Estas dos triosas fosfato son necesarias para la continuación del ciclo de Calvin, así como para la biosíntesis de sacarosa, almidón y otras moléculas orgánicas. La conversión de G-3-P en DHAP (reacción CC-4 en la Figura 11.12) catalizada por la *triosa fosfato isomerasa*, la cual mantiene una cantidad equilibrada de los dos compuestos.

La regeneración de la ribulosa-1,5-bifosfato permite la asimilación continua del carbono

Una de cada seis moléculas de triosa fosfato —la ganancia final después de tres carboxilaciones en el ciclo de Calvin— se usa para la biosíntesis de sacarosa, almidón y otras moléculas orgánicas. Las cinco triosas fosfato restantes se requieren en la fase tercera y final del ciclo de Calvin para la regeneración de tres moléculas de la pentosa aceptora ribulosa-1,5-bifosfato (reacción CC-5). Cuatro reacciones fundamentales —catalizadas por *aldolasas, transcelotasas, fosfatasas,* e *isomerasas*— transforman dos moléculas de DHAP y tres moléculas de G-3-P en tres moléculas de *ribulosa-5-fosfatasa.* Después de esto, la *fosforibuloquinasa* (PRK) fosforila cada ribulosa-5-fosfato para forman la ribulosa-1,5-bifosfato que acepta al dióxido de carbono en la reacción CC-1. De esa manera, la regeneración de la ribulosa-1,5-bifosfato a partir de DHAP y G-3-P consume tres moléculas de ATP. La serie de acontecimientos se puede resumir mediante la siguiente reacción:

$$\text{2DHAP} + \text{3G-3-P} + \text{3ATP} + 2H_2O \longrightarrow \text{3 ribulosa-1,5-bifosfato} + \text{3ADP} + 2P_i \qquad \textbf{(11.12)}$$

El ciclo de Calvin completo

La asimilación primaria del carbono por el ciclo de Calvin se puede resumir sencillamente por la combinación de las Reacciones 11.11 y 11.12, las cuales engloban toda la química del ciclo desde la fijación y la reducción del dióxido de carbono a la síntesis de las triosas fosfato y de la regeneración de la molécula orgánica aceptora. La reacción resultante final es

$$\text{3CO2} + \text{9ATP} + \text{6NADPH} + 5H_20 \longrightarrow \text{G-3-P} + \text{9ADP} + 6NADP^+ + 8P_i \qquad \textbf{(11.13)}$$

Fíjese en el requerimiento de ATP y de NAPDH; el ciclo de Calvin consume nueve moléculas de ATP y seis moléculas de NADPH por cada carbohidrato de tres carbonos sintetizado, o de tres de ATP y dos de NADPH para cada molécula de dióxido de carbono fijada. De esa manera, la actividad de la vía cíclica del PSI es necesaria para producir este exceso de ATP.

Ya que las triosas fosfato generadas por el ciclo de Calvin se consumen en vías metabólicas en el citosol así como en el estroma del cloroplasto, debe haber un mecanismo para el transportarte a través de la membrana interna del cloroplasto. La proteína más abundante de la membrana interna del cloroplasto es un *translocador fosfato* que cataliza el intercambio de DHAP, G-3-P, o 3-fosfoglicerato en el estroma por P_i en el citosol. Este sistema *antiporte* (*véase* Figura 8.7b) asegura que la triosa fosfato no se pueda exportar a no ser que P_i —el cual es requerido sintetizar nuevas triosas fosfato— regrese al estroma. Además, el translocador fosfato es lo suficientemente específico para impedir que otros intermediarios del ciclo de Calvin abandonen el estroma. Las triosas fosfato, dentro del citosol, se pueden usar para la síntesis de sacarosa, como describiremos más adelante, o pueden entrar en la vía glicolítica para proporcionar ATP y NADH en el citosol. Las triosas fosfato que permanecen en el estroma se usan generalmente para la síntesis de almidón, el cual también describiremos en breve.

El ciclo de Calvin está muy regulado para asegurar la máxima eficiencia

Los fotótrofos, en la oscuridad, deben satisfacer la demanda constante de energía y de carbono mediante la explotación del excedente de carbohidratos que se acumulan cuando se dispone de luz. Esta actividad podría ser inútil, sin embargo, si el ciclo de Calvin continuara fijando carbono mientras que la glicolisis y otras vías consumen los carbohidratos almacenados. Esto podría agotar finalmente todas las reservas de energía y de carbono, ya que todas las vías biológicas transcurren al menos al 100% de eficacia termodinámica. No es sorprendente, entonces, que los fotótrofos dispongan de varios sistemas reguladores para asegurar que el ciclo de Calvin se detiene a no ser que se disponga de la luz.

El primer nivel de control es la regulación de la síntesis de las enzimas clave. Las enzimas que son únicamente importantes para la fijación y reducción del dióxido de carbono dependiente de la luz, generalmente no están presentes en los tejidos vegetales que no están expuestos a la luz. Los plastidios en las células de la raíz, por ejemplo, contienen menos de un 1% de la cantidad de rubisco activa de la que está presente en los cloroplastos de las células de la hoja.

Las enzimas del ciclo de Calvin también están reguladas por los niveles de los metabolitos claves. Considere los cambios que ocurren en el estroma del cloroplasto cuando la luz promueve el movimiento de electrones desde el agua a la ferredoxina. El pH del estroma aumenta desde aproximadamente 7,2 (un valor típico en la oscuridad) a aproximadamente 8,0 mientras los protones se bombean desde el estroma hacia el lumen. Simultáneamente, los iones de magnesio difunden en la dirección inversa desde el lumen hacia el estroma, y la concentración de iones de magnesio en el estroma aumenta cinco veces. Finalmente, se acumulan también niveles altos de ferredoxina reducida, NADPH,

y ATP. Cada uno de estos factores sirve como una señal que puede afectar a las enzimas del ciclo de Calvin, así como a las enzimas de otras vías metabólicas.

Tres enzimas, que son exclusivas para el ciclo de Calvin, constituyen los puntos lógicos para el control metabólico. La rubisco es una candidata evidente, ya que cataliza la reacción carboxilación del ciclo de Calvin. Las otras son la *sedoheptulosa difosfatasa* y la *PRK*, las cuales intervienen en la regeneración de la molécula orgánica aceptora ribulosa-1,5-difosfatasa. Estas tres enzimas se estimulan por niveles elevados de pH, y de la concentración de iones de magnesio. En la oscuridad, el pH y los niveles de iones de magnesio disminuyen en el estroma, haciendo que estas enzimas sean poco activas. Estas enzimas no sólo son exclusivas del ciclo de Calvin sino que también catalizan una reacción esencialmente irreversible. Recuerde que en el Capítulo 9 vimos que la vía glicolítica también está regulada en sitios de reacción exclusivas e irreversibles. Este método de regulación de enzimas irreversibles y específicas de una vía es una cuestion común en el metabolismo.

Otro sistema para la coordinación de la transducción de la energía fotosintética y la asimilación del carbono, mostrado en la Figura 11.13, depende de ferredoxina. Los electrones donados por el agua, durante la iluminación, se usan para la reducción de la ferredoxina. Una enzima llamada *ferredoxina tiorredoxina reductasa* cataliza entonces la transferencia de electrones desde la ferredoxina a la *tioredoxina*, otro transportador móvil de electrones. La tiorredoxina afecta a la actividad enzimática reduciendo los puentes disulfuro (S—S) a grupos sulfhídrico (—SH), los cuales provocan que la proteína sufra un cambio conformacional. La

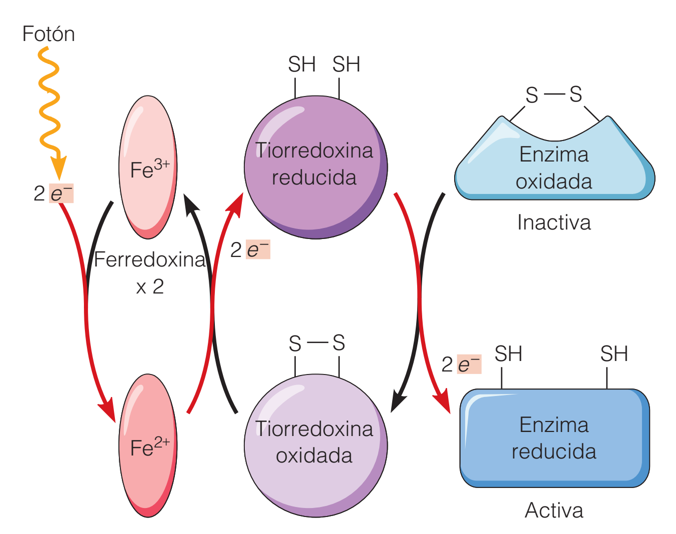


Figura 11.13 Activación mediada por tiorredoxina de una enzima del ciclo de Calvin. Dos moléculas de ferredoxina reducida, generadas por la vía fotorreducción dona electrones a la tiorredoxina, un transportador de electrones intermediario. Posteriormente la tiorredoxina activa una enzima diana reduciendo un puente disulfuro a dos grupos sulfhidrilos. En otros casos, la tiorredoxina puede inactivar enzimas.

gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (reacción CC-3 en la Figura 11.12), la sedoheptulosa bifodfatasa y la PRK también se activan por el cambio conformacional resultante de la reducción de los puentes disulfuro por la tiorredoxina. En la oscuridad, no hay ferredoxina reducida disponible, y los grupos sulfhídrilos se reoxidan espontáneamente a puentes disulfuro, inactivando de ese modo las enzimas. La CF_0CF_1 sintasa descrita anteriormente también es afectada por el sistema de tiorredoxina.

Ya que el ciclo de Calvin produce moléculas de tres carbonos que pueden entrar directamente a la vía glicolítica, la rotura de carbohidratos complejos no es necesaria en condiciones de iluminación. No es sorprendente que los mismos mecanismos que activan las enzimas del ciclo de Calvin inactiven las enzimas de las vías de degradación. Un ejemplo es la *fosfofructoquinasa*, el punto de control más importante de la glicólisis. Mientras el ciclo de Calvin está funcionando en condiciones de iluminación, la inhibición de la fosfofructoquinasa por niveles altos de ATP asegura que se eviten las fases tempranas de la vía de la glicolisis, evitando de ese modo el desarrollo de otro ciclo potencialmente inútil.

Regulación de la fijación de carbono mediante la rubisco activasa

La actividad del ciclo de Calvin también está regulada por la **rubisco activasa,** una proteína que puede modular la actividad de la rubisco. La rubisco activasa funciona mediante la eliminación de compuestos fosfato azucarados inhibidores del sitio activo de la rubisco, estimulando así la capacidad para fijar el carbono de la rubisco. Esto permite que la rubisco tenga actividad catalítica máxima y potencia la fijación del carbono a concentraciones de CO_2 por debajo del nivel óptimo. La rubisco activasa también tiene una actividad ATPasa inherente, la cual es imprescindible para que sea capaz de activar a la rubisco. Esta actividad ATPasa es sensible a la proporción ADP/ATP y es máxima cuando esta proporción es baja (en la luz). La acumulación de ADP, en la oscuridad, inhibe la actividad ATPasa de la rubisco activasa, regulando a la baja la rubisco y manteniendo el suministro de ATP cuando la rubisco no es necesaria.

Además de detectar el estado energético de la célula, la rubisco activasa es tambien sensible al estado de oxidorreducción de la célula a través de la interacción con la tiorredoxina. Trabajos recientes por Archie Portis y sus colaboradores muestran que la inhibición de la actividad inducida por ADP disminuye mucho en condiciones de iluminación por la reducción de un puente de disulfuro en la rubisco activasa mediado por tiorredoxina, permitiendo un incremento de su actividad. Así, la rubisco activasa ayuda a regular el nivel de fijación de carbono por la rubisco respondiendo al nivel de iluminación, la proporción de ADP/ATP, y el estado de oxidorreducción de la célula.

Transducción de la energía fotosintética y ciclo de Calvin

Ahora estamos preparados para escribir una reacción global para la fotosíntesis que considere tanto la transducción de la energía como la asimilación del carbono. Los requerimientos están claros, teniendo en cuenta las necesidades del ciclo de Calvin y suponiendo que no hay desviaciones de ATP o del NADPH hacia otras vías. La síntesis de una molécula de gliceraldehído-3-fosfato (o de dehidroxiacetona fosfato), según la Reacción 11.13, necesita nueve moléculas de ATP y 6 moléculas de NADPH. Esta demanda se puede satisfacer mediante el flujo de 12 electrones a través de la vía no cíclica, la cual proporciona el total de las seis moléculas de NADPH (3 × la Reacción 11.8) y ocho de las nueve moléculas de ATP (8 × la Reacción 11.9), más el flujo de 2 electrones a través por la vía cíclica, que proporciona al menos una molécula de ATP (1 × la Reacción 11.9). Luego, la reacción final de la energía de transducción es

$$26 \text{ fotones} + 9 \text{ ADP} + 9P_i + 6NADP^+ \longrightarrow O_2 + 9 \text{ ATP} + 6NADPH + 3H_20 \qquad \textbf{(11.14)}$$

La absorción de 26 fotones se produce por mediante 12 eventos de fotoexcitación en PSI y 12 en PSII durante el flujo no cíclico de electrones, y 2 eventos de fotoexcitación en PSI durante el flujo cíclico de electrones.

Adicionando la reacción resumida del ciclo de Calvin (Reacción 11.13) a la reacción final de la transducción de la energía (Reacción 11.14), obtenemos la siguiente expresión global:

$$26 \text{ fotones} + 3CO_2 + 5H_2O + P_i \longrightarrow \text{G-3-P} + 3O_2 + 3H_2O \qquad \textbf{(11.15)}$$

Debido a que el grupo fosfato generalmente se elimina mediante hidrólisis cuando G-3-P se incorpora a compuestos orgánicos mas complejos, podemos reescribir la Reacción 11.15 como:

$$26 \text{ fotones} + 3CO_2 + 6H_2O \longrightarrow \text{Gliceraldehído} + 3O_2 + 3H_2O \qquad \textbf{(11.16)}$$

Esta reacción es casi idéntica a la reacción fotosintética neta que introdujimos al principio de este capítulo (la Reacción 11.2). Ahora estamos, sin embargo, en una posición mucho mejor para entender parte de la complejidad fotoquímica y metabólica que hay detrás y que podría parecer una reacción simple. Además, hemos reemplazado los términos imprecisos de «luz» y «$C_3H_6O_3$», por números específicos de fotones y del producto primario de la fijación del dióxido de carbono.

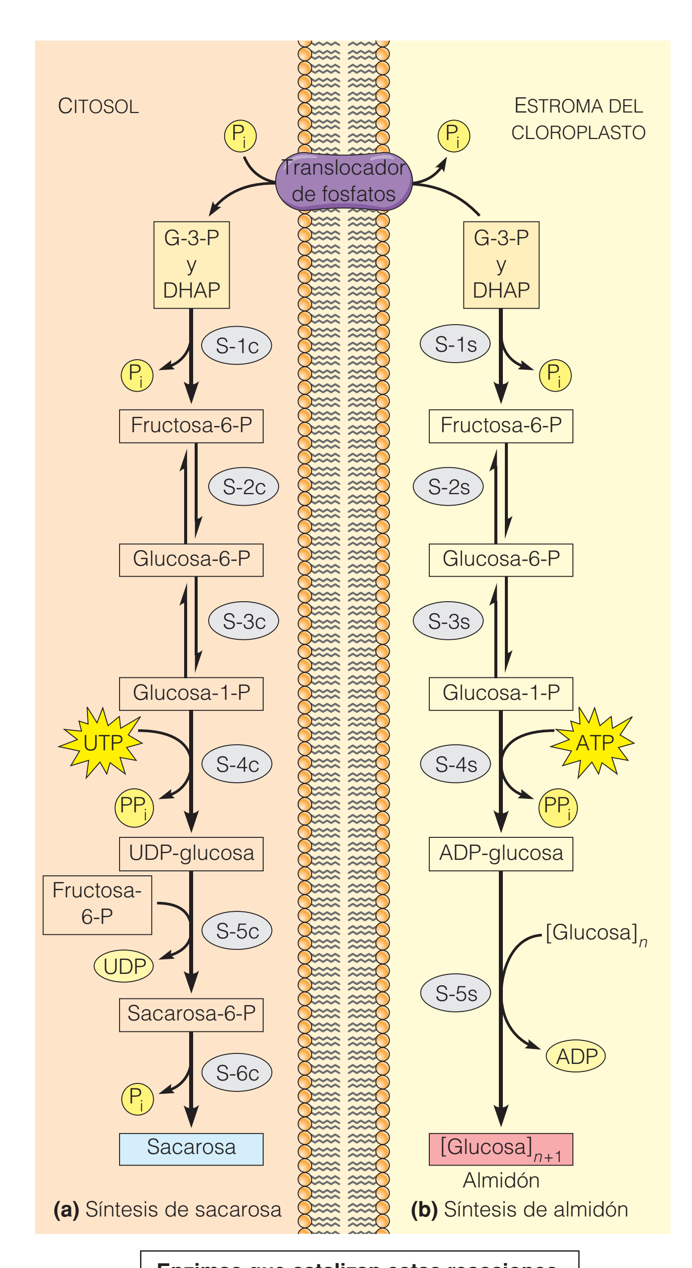
Esta información nos permite calcular la eficiencia máxima de la transducción de la energía fotosintética y de la asimilación del carbono. Para la luz roja, suponiendo una longitud de onda de 670 nm, 26 fotones representan 26 × 43 Kcal/einstein (*véase* Figura 2.3 para la relación entre longitud de onda y energía; un einstein equivale a un mol de fotones), o un total de 1.118 Kcal de energía. Puesto que el gliceraldehído difiere del dióxido de carbono y del agua en 343 Kcal/mol en la variación de la energía libre, la eficiencia máxima de la transducción de energía fotosintética es aproximadamente del 31% (343/1118 = 0,31). Aunque una eficiencia de este orden se podría observar en el laboratorio con cloroplastos aislados o con células de alga, la fotosíntesis es mucho menos eficiente en un ambiente natural. Consideraremos algunos de los factores que limitan la productividad global de un organismo fotosintético después de considerar la síntesis de carbohidratos (*véase* también el Problema 11.8).

Síntesis de carbohidratos

El ciclo de Calvin, como ya hemos aprendido, genera una reserva interconvertible de gliceraldehído-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato, las cuales se pueden transportar fuera del cloroplasto por el translocador fosfato situado en la membrana interna del cloroplasto. En cambio, estas triosas fosfato son los puntos de inicio para la síntesis de almidón dentro del cloroplasto y para la síntesis de sacarosa en el citosol (Figura 11.14). Aquí, consideraremos ambas vías, cada una de las cuales comienza con la formación de las hexosas fosfato.

El gliceraldehído-3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato se combinan para forman glucosa-1-fosfato

La hexosa fosfato clave requerida para la síntesis de almidón y sacarosa es la glucosa-1-fosfato, la cual se forma a partir de las triosas fosfato como se muestra en la Figura 11.14, y en las reacciones S-1 a S-3. Este grupo de reacciones ocurren tanto en el citosol (c) como en el estroma del cloroplasto (s). Las hexosas y hexosas fosfato deben ser sintetizadas en cada compartimiento ya que no pueden atravesar la membrana interna del cloroplasto. Los pasos iniciales en la secuencia se parecen a las reacciones que encontramos en nuestra discusión sobre la gluconeogénesis en el Capítulo 9 (*véase* Figura 9.11). El primer paso en la utilización de la triosa fosfato es una reacción de condensación catalizada por una aldolasa que genera fructosa-1,6-difosfato. Como en la gluconeogénesis. La vía es exergónica por la eliminación hidrolítica de un grupo fosfato desde la fructosa-1,6-difosfato para formar la fructosa-6 fosfato. La enzima que cataliza esta reacción, la fructosa-1,6-difosfatasa, existe en dos formas, una en el citosol y la otra en el estroma del cloroplasto. Las formas múltiples de una enzima como ésta se llaman **isoenzimas** —proteínas físicamente distintas que catalizan la misma reacción. Después, la fructosa-6-fosfato puede convertirse a glucosa-1-fosfato, a través de la glucosa-6-fosfato (reacciones S-2 y S-3). De nuevo, cada una de estas reacciones en el citosol y en estroma del cloroplasto está catalizada por isoenzimas distintas.



Enzimas que catalizan estas reacciones

S-1: Adolasa y fructosa-1,6-bifosfato
S-2: Fosfoglucoisomerasa
S-3: Fosfoglucomutasa
S-4c: UDP-glucosa fosforilasa
S-5c: Sacarosa fosfato sintasa
S-6c: Sacarosa fosfatasa
S-4s: ADP-glucosa pirofosforilasa
S-5s: Almidón sintasa

Figura 11.14 Biosíntesis de sacarosa y almidón a partir de los productos del ciclo de Calvin. Las triosas fosfato gliceraldehído-3-fosfato (G-3-P) y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) procedentes del estroma del cloroplasto se intercambian por fosfato inorgánico procedente del citosol, mediante un translocador de fosfatos. **(a)** La síntesis de sacarosa se restringe al citosol, mientras **(b)** la síntesis de almidón ocurre sólo en el estroma del cloroplasto. Las enzimas e isoenzimas que catalizan estas reacciones están restringidos al citosol (c) o al estroma (s).

Los libros de texto a menudo representan a la glucosa como el producto final de la asimilación del carbono fotosintético. Pero esta representación es más una definición de conveniencia para escribir las reacciones resumidas que un hecho metabólico, ya que en las células fotosintéticas se acumulan muy poca glucosa libre. La mayor parte de la glucosa se convierte en carbohidratos de transporte, como la sacarosa, o en carbohidratos de almacenamiento tales como el almidón en las plantas o el glucógeno en las bacterias fotosintéticas. En realidad, la designación de un producto final para la asimilación del carbono fotosintético se hace un tanto arbitraria una vez que se supera la reserva de triosas fosfato, producidas por el ciclo de Calvin. Es más, podríamos considerar al organismo fototrópico completo —planta, célula de un alga, o bacteria— como «el producto final» de la fotosíntesis.

La biosíntesis de sacarosa ocurre en el citosol

Recuerde que en el Capítulo 3 vimos que la sacarosa es un disacárido compuesto por una molécula de glucosa y una molécula de fructosa unidas mediante un enlace glicosídico (*véase* Figura 3.23). La sacarosa es interesante porque es el principal carbohidrato empleado para transportar la energía almacenada y el carbono reducido en la mayoría de las especie de plantas. Además, en algunas especies como la remolacha azucarera o la caña de azúcar, la sacarosa también sirve como un carbohidrato de almacenamiento. La síntesis de sacarosa, como se muestra en la Figura 11.4a, se localiza en el citosol de las células fotosintéticas. Las triosas fosfato exportadas desde el estroma del cloroplasto que no se consumen por otras vías metabólicas se convierten en fructosa-6-fosfato y en glucosa-1-fosfato. La glucosa de la glucosa-1-fosfato se activa entonces por la reacción de la glucosa-1-fosfato con *uridina trifosfato* (UTP), generando *UDP-glucosa* (reacción S-4c). Finalmente, la glucosa se transfiere a la fructosa-6-fosfato para formar el disacárido fosforilado la *sacarosa-6-fosfato*, y la eliminación hidrolítica del grupo fosfato genera una sacarosa libre (reacciones S-5c y S-6c). (En algunas especies de plantas, la glucosa puede ser transferida directamente desde UDP-glucosa a la fructosa libre.) La sacarosa se exporta desde las hojas y proporcionala energía y el carbono reducido a tejidos no fotosintéticos del organismo.

La síntesis de sacarosa, como el ciclo de Calvin, está controlada de forma precisa para evitar conflictos con las vías de degradación. La fructosa-1,6-difosfatasa *citosólica*, por ejemplo, se inhibe con la *fructosa-2,6-difosfato*, un metabolito introducido en el Capítulo 10 como un regulador importante de la glicolisis y de la gluconeogénesis en las células hepáticas. La fructosa-2,6-difosfato se acumula en células vegetales en respuesta a niveles altos de fructosa-6-fosfato y P_i (señales que indican una demanda baja de sacarosa) o a niveles bajos de 3-fofoglicerato y de dihidroxiacetona fosfato (señales que indican una alta demanda de triosas fosfa-

to). Otro punto de control para la síntesis de sacarosa es la *sacarosa fosfato sintasa,* la enzima que cataliza la transferencia de glucosa desde UDP-glucosa a la fructosa-6-fosfato (reacción S-5c). Esta enzima se estimula por la glucosa-6-fosfato y se inhibe por sacarosa-6-fosfato, UDP, y P_i.

La biosíntesis de almidón se produce en el estroma del cloroplasto

La síntesis de almidón en las células vegetales se restringe a plastidios. La síntesis de almidón, en las células de plantas fotosintéticas, se limita generalmente a los cloroplastos, que son esencialmente plastidios fotosintéticos. Cuando se dispone de energía y de carbono suficiente para cubrir las necesidades metabólicas de una planta, las triosas fosfato dentro del estroma del cloroplasto se convierten a glucosa-1-fosfato, la cual se usa entonces para la síntesis de almidón. La glucosa, como se muestra en la Figura 11.14b, se activa por la reacción de la glucosa-1-fosfato con ATP, generando *ADP-glucosa* (reacción S-4s). La glucosa activada se transfiere directamente entonces a cadenas de almidón en crecimiento mediante la *almidón sintasa*, induciendo la elongación del polisacárido (reacción S-5s). El almidón, como se muestra en la Figura 11.2a, se puede acumular en grandes gránulos de almacenamiento dentro del estroma del cloroplasto. Cuando la fotosíntesis está limitada por la oscuridad u otros factores, el almidón se degrada a triosas fosfato, las cuales pueden entrar entonces en la glicolisis o pueden convertirse en sacarosa en el citosol y exportarse desde la célula.

La síntesis de almidón, como el ciclo de Calvin y la síntesis de sacarosa, está controlada con precisión. La fructosa difosfatasa del cloroplasto, la cual canaliza la fructosa-1,6-difosfato hacia glucosa y hacia la síntesis de almidón en el estroma, se activa por el mismo sistema de tiorredoxina que afecta a las enzimas del ciclo de Calvin. Esto asegura que la síntesis de almidón sólo se produce cuando hay suficiente iluminación para la fotorreducción. La enzima clave para la regulación, sin embargo, es la *ADP-glucosa pirofosforilasa,* la cual cataliza la activación de la glucosa y la compromete para la síntesis de almidón mediante la formación de ADP-glucosa (reacción S-4s). La ADP-glucosa pirofosforilasa se estimula por gliceraldehído-3-fosfato y se inhibe por P_i. Así, cuando las triosas fosfato se desvían hacia el citosol y el ATP es hidrolizado a ADP y Pi (señales que indican una demanda alta de energía), la síntesis de almidón se bloquea.

Otras vías de asimilación fotosintética

La fotosíntesis incluye otros procesos además de la fijación del dióxido de carbono y la síntesis de carbohidratos. El ATP y el NADPH generados por las reacciones de transducción de la energía fotosintética, en las plantas y en las algas, se consume por diversas vías anabólicas presentes en los cloroplastos. La síntesis de carbohidratos es sólo un ejemplo del metabolismo del carbono; también se producen en el cloroplasto síntesis de ácidos grasos, de clorofilas y de carotenoides. Más allá del metabolismo del carbono, en los cloroplastos se localizan varios pasos claves para la asimilación del nitrógeno y del sulfuro. La reducción del nitrato ($NO2^{-}$) a amoniaco (NH_3), por ejemplo, se cataliza por una enzima reductasa en el estroma del cloroplasto, y la ferredoxina reducida sirve como donador de electrones. El amoniaco se canaliza entonces hacia la síntesis de aminoácidos y de nucleótidos, parte de las cuales también ocurren en el cloroplasto. Además, la mayor parte de la reducción del ion sulfato (SO_4^{2-}) a ion sulfuro (S^{2-}) se cataliza por enzimas en el estroma del cloroplasto. En este caso, tanto el ATP como la ferredoxina reducida proporcionan la energía y el poder reductor. El ion sulfuro, como el amoníaco, se pueden usar entonces para la síntesis de amoníaco.

La actividad oxigenasa de la rubisco disminuye la eficiencia fotosintética

La reacción principal catalizada por la rubisco —actuando como una *carboxilasa*— es la adición del dióxido de carbono y de agua a la ribulosa-1,5-difosfato, formando dos moléculas de 3-fosfoglicerato. Sin embargo, la rubisco también puede funcionar como una *oxigenasa.* A través de esta actividad, la rubisco cataliza la adición del oxígeno molecular, en lugar de dióxido de carbono, a la ribulosa 1,5-difosfato.

$$\underset{\text{Ribulos-1,5-difosfato}}{H_2C(O\text{–}P)\text{–}C(=O)\text{–}CH(OH)\text{–}CH(OH)\text{–}CH_2(O\text{–}P)} \xrightarrow{O_2 \;\; 2H^+} \underset{\text{Fosfoglicolato}}{{}^-O\text{–}C(=O)\text{–}CH_2(O\text{–}P)} + \underset{\text{3-fosfoglicerato}}{{}^-O\text{–}C(=O)\text{–}CH(OH)\text{–}CH_2(O\text{–}P)} \qquad \textbf{(11.17)}$$

El resultado de la actividad oxigenasa de la rubisco es un único producto de tres carbonos —3-fosfoglicerato— y un producto de 2 carbonos, **fosfoglicolato**. Esto parece ser un derroche de material procedente de la asimilación del carbono, ya que el fosfoglicolato no se puede usar en el paso siguiente del ciclo de Calvin. Además, las funciones alternativas para la actividad oxigenasa de la rubisco no se han

demostrado claramente. Es más, la producción de fosfoglicolato no sólo gasta energía y carbono, la acumulación de fosfoglicolato puede matar a una planta por inhibición de la triosa fosfato isomerasa que mantiene el equilibrio entre el gliceraldehido-3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato en el estroma del cloroplasto.

Teniendo en cuenta que la rubisco tiene menos afinidad por oxígeno que por el dióxido de carbono y que la reacción oxigenasa se produce mucho más lentamente que la reacción carboxilasa, podríamos suponer que la reacción oxigenasa no es un problema. Sin embargo, la concentración baja del dióxido de carbono y las altas concentraciones del oxígeno en la atmósfera de la tierra —aproximadamente 0,035% y un 21% respectivamente— conducen a una competencia significativa entre el dióxido de carbono y el oxígeno para unirse al sitio catalítico de la rubisco. La baja proporción de CO_2:O_2, dentro de una hoja típica o una célula de un alga expuesta a la atmósfera, conduce a una oxigenación de la ribulosa-1,5-disfofato cada dos o tres acontecimientos de carboxilación, reduciendo seriamente la eficiencia fotosintética y generando grandes cantidades de fosfoglicolato.

La actividad oxígenasa de la rubisco afecta especialmente a las plantas que viven en un ambiente árido y cálido bajo una iluminación intensa, ya que tales condiciones pueden disminuir más la proporción CO_2:O_2 en el estroma del cloroplasto. Aunque la solubilidad tanto del dióxido de carbono como del oxígeno disminuye a medida que aumenta la temperatura, la solubilidad del dióxido de carbono disminuye más rápidamente, de ese modo disminuyendo la relación CO_2:O_2 disueltos. Se produce otro problema cuando las plantas responden a la sequía mediante el cierre de sus estomas durante el día para reducir la pérdida de agua. Cuando se cierran los estomas, el dióxido de carbono no puede entrar en la hoja. Sin un suministro estable del dióxido de carbono para la asimilación, puede disminuir la concentración de dióxido de carbono en las células de las hojas. Además, la fotolisis del agua continúa generando oxígeno, que se acumula porque no puede difundir fuera de la hoja cuando los estomas están cerrados. La luz del sol intensa exacerba este problema aumentando el ritmo de la fotolisis del agua, la cual depende de la absorción de la luz que induce el flujo no cíclico de electrones y la fotorreducción.

Los esfuerzos para reducir la actividad oxigenasa de la rubisco a través de la alteración de la secuencia de aminoácidos de la enzima han sido en gran parte un fracaso, ya que la disminución de la actividad oxigenasa es acompañada generalmente de una disminución compensadora en la actividad carboxilasa. ¿Por qué entonces tiene la rubisco esta actividad oxigenasa perjudicial? Según una teoría, la actividad oxigenasa es una reliquia evolutiva de un momento en el que oxígeno no suponía una parte importante de la atmósfera de la Tierra, y no se ha podido eliminar sin comprometer seriamente la función carboxilasa. Ni siquiera la selección natural parece estar dispuesta para la tarea de alterar esta enzima. En cambio, los fotófrofos que dependen de la rubisco han desarrollado tres estrategias alternativas para hacer frente a la aparentemente derrochadora, actividad oxigenasa de la enzima. Consideraremos brevemente cada estrategia en las siguientes discusiones sobre la *vía fotorrespiratoria del glicolato, la fotosíntesis C4* y el *metabolismo del ácido de las crasulaceas.*

La vía del glicolato devuelve al ciclo de Calvin el carbono reducido a partir de fosfoglicolato.

El fosfoglicolato generado por la actividad oxigenasa de la rubisco es canalizado hacia la **vía del glicolato** en todas las células de las plantas fotosintéticas. Esta *vía de recuperación* se deshace del fosfoglicolato y retorna alrededor del 75% del carbono reducido presente en el fosfoglicolato lo retorna hacia el ciclo de Calvin como 3-fosfoglicerato. Ya que la vía del glicolato se caracteriza por la captación del oxígeno dependiente de la luz y por la evolución del dióxido de carbono también se denomina como **fotorrespiración**.

Varios pasos de la vía del glicolato se localizan en un tipo especial de peroxisomas llamados el **peroxisoma de la hoja**. Los peroxisomas, como aprendimos en el Capítulo 4, son unos orgánulos que contienen enzimas oxidasas que generan peróxido de hidrógeno. El potencial peróxido de hidrógeno, que es potencialmente destructivo, se elimina entonces por otra enzima del peroxisoma, la catalasa que lo degrada a agua y oxígeno. Los peroxisomas se encuentran en todos los tejidos de las plantas fotosintéticas, debido a su papel esencial en la vía del glicolato.

En la micrografía electrónica de la Figura 4.20b se muestra un peroxisoma de la hoja típico de una célula del mesófilo. El núcleo cristalino dentro de la matriz del orgánulo se compone de la catalasa, una enzima marcador del peroxisoma. Fíjese en la proximidad del peroxisoma de la hoja a un cloroplasto y a una mitocondria. Esta asociación se encuentra frecuentemente en las células de las plantas fotosintéticas y muy probablemente reflejen la participación de los tres orgánulos en la vía del glicolato (Figura 11.15).

El fosfoglicolato, generado por la rubisco en el cloroplasto, es rápidamente desfosforilado en el estroma por una fosfatasa (reacción GP-1). El producto es el *glicolato*, el cual difunde a algún una peroxisoma de la hoja cercano, donde una *oxidasa* lo convierte en glioxilato (reacción GP-2). Se supone que, la yuxtaposición cercana del cloroplasto y el peroxisoma en las células fotosintéticas contribuyen a la transferencia eficiente de los metabolitos desde un orgánulo a otro. La oxidación del glicolato va acompañado de la captación de oxígeno y la generación de peróxido de hidrógeno, el cual se degrada inmediatamente a oxígeno y a agua por la catalasa (reacción GP-C). En la siguiente reacción en el peroxisoma, una *aminotransferasa* cataliza la transferencia de un grupo amino desde el glutamato al glioxilato, formando la glicina (reacción GP-3).

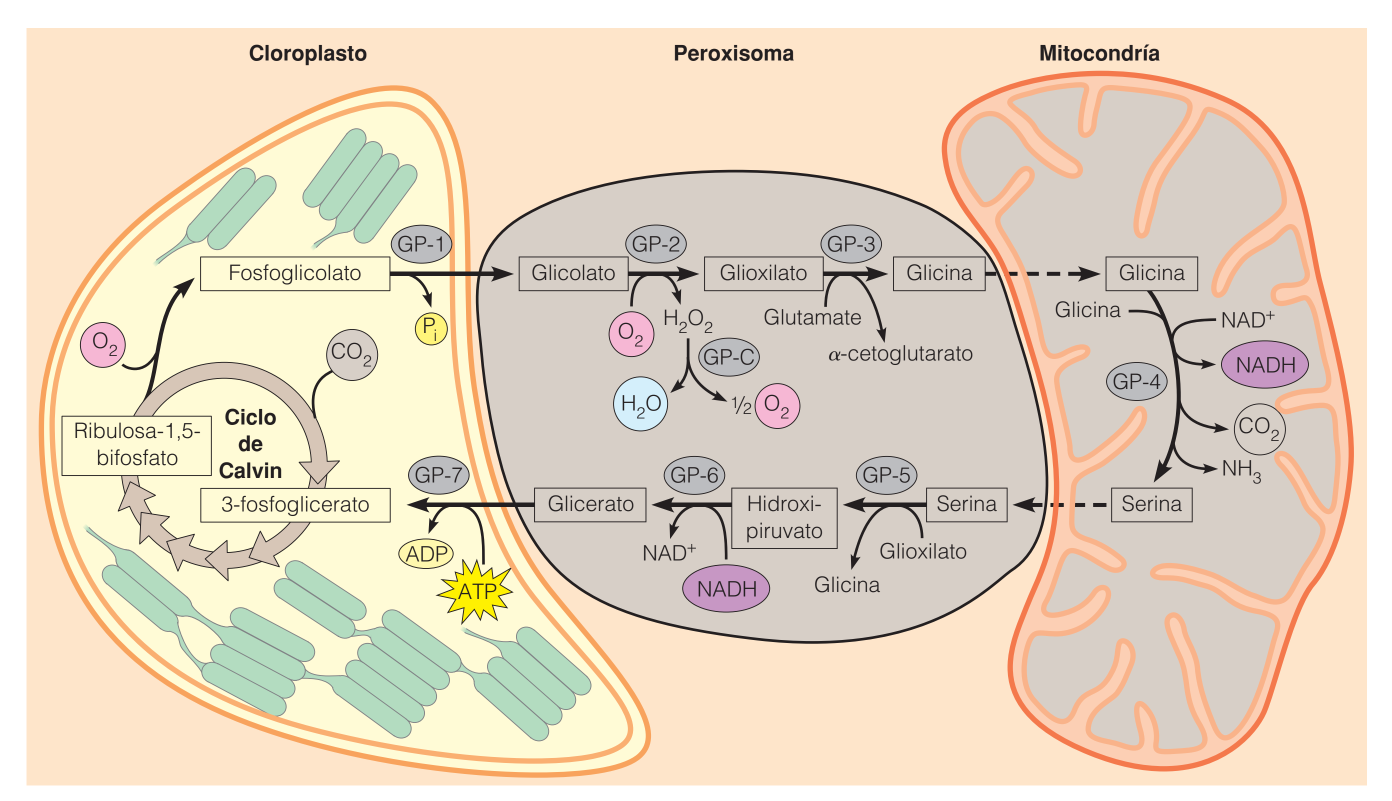


Figura 11.15 La vía del glicolato. El glicolato aparece como resultado de la actividad oxigenasa de la rubisco. El producto inmediato es el fosfolicolato, el cual se convierte en glicolato libre por una fosfatasa localizada en la membrana del cloroplasto (reacción GP-1). El glicolato libre difunde fuera del estroma del cloroplasto y se metaboliza por una ruta de cinco pasos (GP-2 a GP-6) que ocurre parcialmente en el peroxisoma y parcialmente en la mitocondria. Entonces el glicerato difunde hacia el cloroplasto y se fosforila para formar el 3-fosfoglicerato (reacción GP-7), el cual entra en el ciclo de Calvin. La captación de oxígeno y la evolución del dióxido de carbono característica de la fotorrespiración suceden en el peroxisoma (reacción GP-2) y en la mitocondria (reacción GP-4), respectivamente.

Enzimas que catalizan estas reacciones

GP-1:	Fosfoglicolato fosfatasa
GP-2:	Glicolato oxidasa
GP-3:	Glutamato: glioxilato aminotransferasa
GP-4:	Glicina descarboxilasa y serina hidroximetil transferasa
GP-5:	Serina: glioxilato aminotransferasa
GP-6:	Hidroxipiruvato reductasa
GP-7:	Glicerato quinasa
GP-C:	Catalasa

La glicina difunde desde el peroxisoma de la hoja a una mitocondria, donde la actividad de dos enzimas que funcionan en serie —una *decarboxilasa* y una *hidroximetil transferasa*— convierte dos moléculas de glicina en una única *serina*, de forma paralela a la generación de NADPH y la liberación del dióxido de carbono y un amoníaco (reacción GP-4). La actividad oxigenasa de la rubisco por lo tanto no sólo conduce a la pérdida de carbono, sino también a una pérdida potencial de nitrógeno. Para evitar el agotamiento de las reservas de nitrógeno el amoníaco se debe reasimilar a expensas del consumo ATP y poder reductor.

La serina difunde de nuevo hacia el peroxisoma, donde otra aminotransferasa elimina el grupo amino, generando *hidroxipiruvato* (reacción GP-5). Una *reductasa*, usando NADH como donador de electrones, reduce entonces el hidroxipiruvato a *glicerato* (reacción GP-6). Por último, el glicerato difunde hacia el cloroplasto, donde se fosforila por la *glicerato quinasa* para generar 3-fosfoglicerato (reacción GP-7), un intermediario clave del ciclo de Calvin.

¿Cuál es el beneficio de esta larga vía de recuperación, que tiene lugar a través de varios orgánulos? Tres de cada cuatro átomos de carbono que salen del ciclo de Calvin como parte de fosfoglicolato se recuperan como 3-fosfoglicerato. Sin esta vía, no sólo podría acumularse fosfoglicolato hasta niveles tóxicos, sino también se podrían agotar las triosas fosfato que son imprescindibles para la regeneración de la ribulosa-1,5-difosfato y la continuación del ciclo de Calvin. Sin embargo, el metabolismo de fosfoglicolato es costoso, en términos de energía y de carbono reducido. Por cada tres átomos de carbono que se recuperan se debe reasimilar una molécula de amoníaco a expensas de una molécula de ATP y de dos moléculas de ferredoxina reducida, y el glicerato generado por la reacción GP-6 se debe fosforilar a expensas de una molécula de ATP. Sin embargo, la fotorrespiración es finalmente beneficiosa para la planta, ya que la actividad oxigenasa de la rubisco es aparentemente inevitable. Considere únicamente el valor de los tres átomos de carbono recuperados: cuando se fijaron y se

redujeron inicialmente se consumieron nueve ATP y seis NADPH.

Las plantas C_4 minimizan la fotorrespiración confinando la rubisco a células que contienen concentraciones altas de CO_2

Como se mencionó anteriormente, las plantas de ambientes áridos y calurosos bajo una iluminación intensa, se afectan especialmente por la actividad oxigenasa de la rubisco. En algunos casos, la cantidad de energía y de carbono que se pierde a través de la fotoresspiración y es tan grande que las plantas deben depender de estrategias adaptativas para solucionar el problema. Una solución general es limitar a la rubisco a las células que contengan una concentración alta de dióxido de carbono, minimizando así la actividad oxigenasa inherente.

En muchas hierbas tropicales, incluyendo plantas con importancia económica como el maíz, el sorgo y la caña de azúcar, el aislamiento de la rubisco está acompañado de un vía corta de carboxilación/descarboxilación denominada como el **ciclo de Hatch-Slack,** en honor de Marshall D. Hatch y C. Roger Slack, dos fisiólogos vegetales quienes desempeñaron papeles claves en la elucidación de la vía. Las plantas que contienen esta vía se denominan como **plantas C_4** porque el producto inmediato de la fijación del carbono a través del ciclo de Hatch-Slack es un ácido orgánico de cuatro carbonos llamado oxalacetato. Este término distingue estas plantas de las **plantas C_3**, en las que el primer producto detectable de la fijación del dióxido de carbono es el compuesto de tres carbonos 3-fosfoglicerato.

Para apreciar la ventaja del ciclo de Hatch-Slack, primero debemos considerar la disposición de los ciclos de Hatch-Slack y de Calvin dentro de la hoja de una planta C_4. Las plantas C_4, como se muestra en la Figura 11.16, a diferencia de las plantas C_3, tienen en sus hojas dos clases distintas de células fotosintéticas —las *células del mesófilo* y las *células de la vaina del haz*— que difieren en sus composiciones enzimáticas y por tanto en sus actividades metabólicas. Los primeros pasos de la fijación del dióxido de carbono en una planta C4 se consiguen por el ciclo de Hatch-Slack en las células de mesófilo, que están expuestas al dióxido de carbono y al oxígeno que entran en la hoja a través de sus estomas. El dióxido de carbono que se fija en las células mesófilas posteriormente se libera en las **células de la vaina del haz**, que están aisladas relativamente de la atmósfera. El ciclo de Calvin completo, incluyendo a la rubisco, se limita a los cloroplastos de las células de la vaina del haz. La concentración de dióxido de carbono en las células de la vaina del haz puede ser hasta diez veces los niveles de la atmósfera, debido la actividad del ciclo de Hatch-Slack, lo que favorece intensamente la actividad carboxilasa de la rubisco y minimiza su actividad oxigenasa.

Como se detalla en la Figura 11.17, el ciclo de Hatch-Slack comienza con la carboxilación de *fosfoenolpiruvato* (PEP) para formar oxalacetato (reacción HS-1). Tanto PEP como oxalacetato pueden resultarle familiares, ya que encontramos previamente la misma reacción de carboxila-

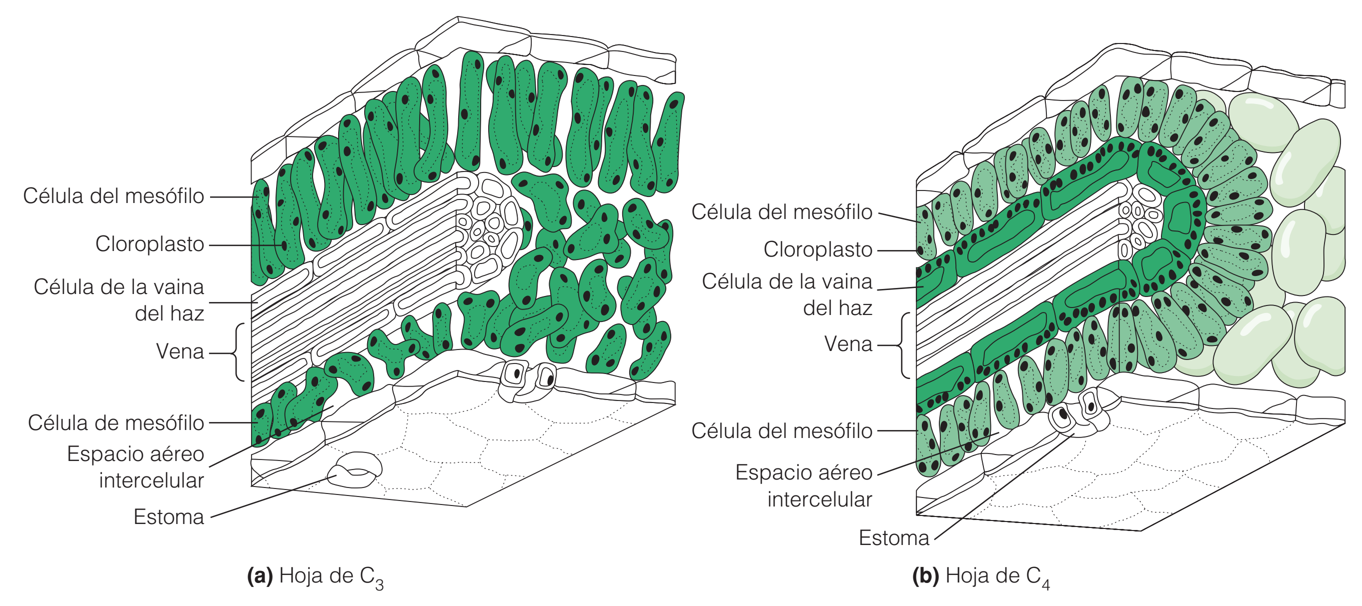


Figura 11.16 Diferencias estructurales entre las hojas de las plantas C_3 y C_4. (**a**) En las plantas C_3, el ciclo de Calvin ocurre en las células del mesófilo. (**b**) En las plantas C_4 se limita a las células de la vaina del haz, las cuales están relativamente aisladas del dióxido de carbono y del oxígeno atmosférico. Las plantas C_4 utilizan el ciclo de Hatch-Slack para recoger el dióxido de carbono en las células del mesófilo y lo concentran en las células de la vaina del haz. Las células de la vaina del haz rodean los haces vasculares (venas) de la hoja, las cuales transportan los carbohidratos a otras partes de la planta. Esta colocación concéntrica se llamó anatomía de kranz (en alemán de «aureola» o «corona») y es esencial para la eficiencia fotosintética de las plantas C_4.

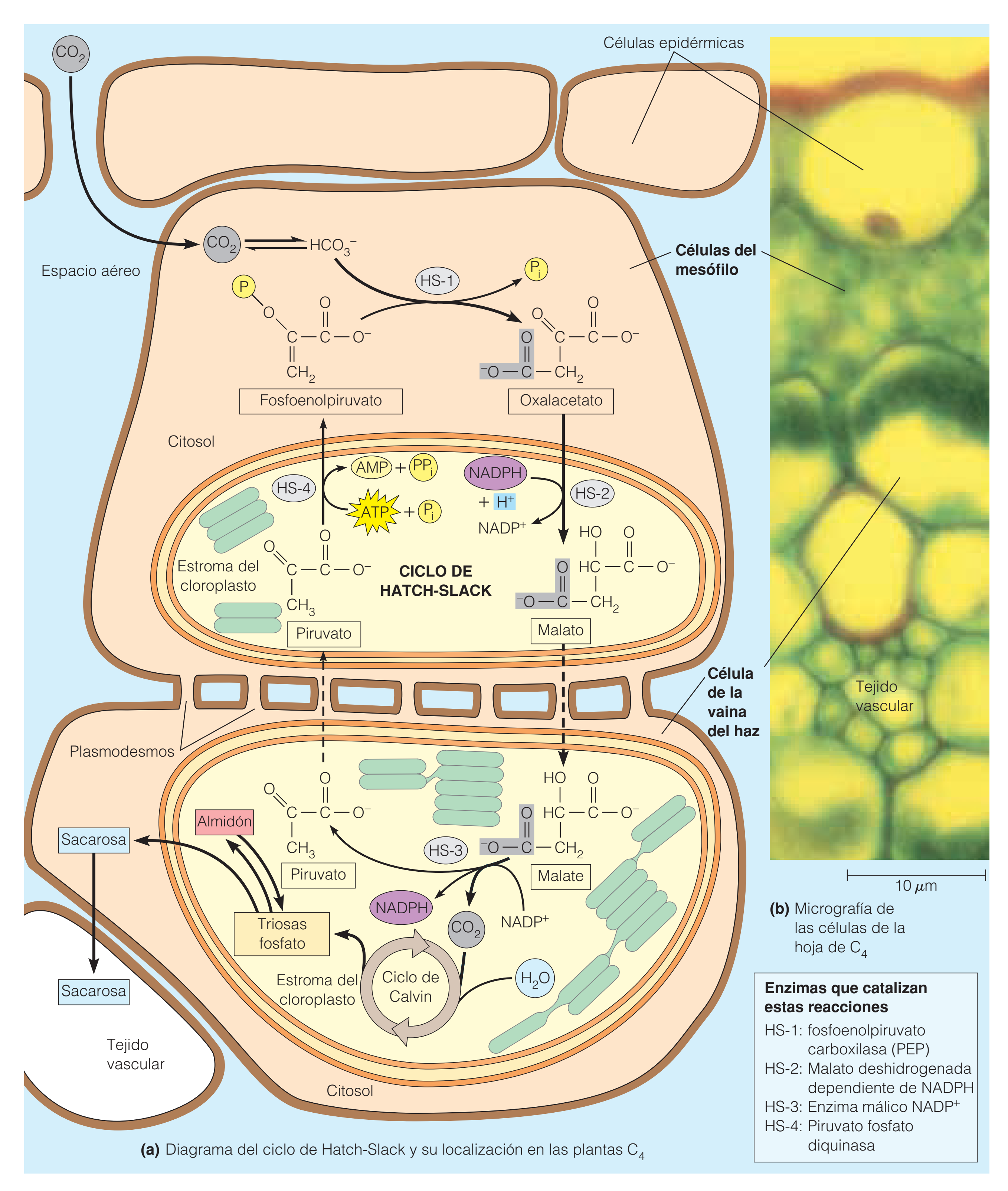


Figura 11.17 Localización del ciclo de Hatch-Slack en distintas células de una hoja C_4. (**a**) La fijación del dióxido de carbono en las plantas C_4 inicialmente ocurre por el ciclo de Hatch-Slack en las células del mesófilo, para formar oxalacetato. (El camino de entrada que sigue el carbono se indica mediante flechas de color negro intenso.) El malato formado por la reducción del oxalacetato pasa entonces hacia el interior de las células de la vaina del haz, donde se descarboxila. El dióxido de carbono se fija de nuevo por el ciclo de Calvin, produciendo finalmente sacarosa, la cual pasa hacia el tejido vascular contiguo para transportarla a otras partes de la planta. Las enzimas que catalizan las reacciones de Hatch-Slack se nombran en el recuadro inferior derecho. La enzima piruvato fosfato diquinasa, la cual cataliza la fosforilación del piruvato, es exclusiva del ciclo de Hatch-Slack. (**b**) La hoja C_4 específica que se muestra corresponde al maíz, *Zea Mays* (LM).

ción como una forma de proporcionar oxalacetato para el ciclo TCA (*véase* Figura 10.10). La carboxilación es catalizada por una forma citosólica específica de *PEP carboxilasa*, la cual es especialmente abundante en las células del mesófilo de las plantas C_4. Esta carboxilasa no sólo carece de la actividad oxigenasa de la rubisco, sino que además es un excelente eliminador de dióxido de carbono. En otras palabras, tiene una alta afinidad (K_m baja) por su sustrato, *bicarbonato* (HCO_3^-), y funciona de forma muy eficiente cuando la concentración de bicarbonato es muy baja. (El bicarbonato se forma cuando el dióxido de carbono se disuelve en el agua; su concentración por lo tanto refleja la disponibilidad del gas de dióxido de carbono.)

En una versión de la vía Hatch-Slack, el oxalacetato generado por la PEP carboxilasa se convierte rápidamente en malato por una *malato deshidrogenada dependiente de NADPH* (reacción HS-2 en la Figura 11.17). El malato es un ácido de cuatro carbonos estable que transporta el carbono desde las células mesófilo hasta los cloroplastos de las células de la vaina del haz, donde es descarboxilado por la *enzima málico NADP*$^+$ liberando CO_2 (reacción HS-3). El dióxido de carbono liberado se fija de nuevo y se reduce por el ciclo de Calvin. (En otras versiones de la vía de Hatch-Slack, la decarboxilación ocurre o bien en la mitocondria, mediante la *enzima málico NADP*$^+$, como en el citoplasma, vía *PEP carboxiquinasa.* En las tres versiones, sin embargo, las células del mesófilo contiene las enzimas claves *PEP carboxilasa* y *piruvato, fosfato diquinasa*, que constituyen los puntos de control importantes para la regulación dependiente de la luz.) El ciclo de Hatch-Slack también transfiere poder reductor desde las células del mesófilo a las células de la vaina del haz, ya que la decarboxilación de malato va acompañada de la generación de NADPH. Esto podría limitar la demanda del flujo cíclico de electrones desde el agua a $NADP^+$ en las células de la vaina del haz, minimizando de ese modo la formación del oxígeno mediante el complejo PSII y favoreciendo la actividad carboxilasa de la rubisco.

El piruvato generado por la decarboxilación del malato difunde hacia las células de mesófilo, donde se fosforila a expensas de ATP para regenerar PEP (reacción HS-4), el aceptor original del dióxido de carbono del ciclo de Hatch-Slack. De esa manera, el proceso completo es cíclico, y el resultado final es un sistema de alimentación que captura el dióxido de carbono en las células del mesófilo y lo pasa al ciclo del Calvin en las células de la vaina del haz. El ciclo de Hatch-Slack no sustituye al ciclo de Calvin; es sólo una secuencia preliminar de carboxilación/decarboxilación que concentra el CO_2 en las células de la vaina del haz.

El coste real del desplazamiento del carbono desde las células del mesófilo a las células de la vaina del haz es equivalente a dos moléculas de ATP por molécula de dióxido de carbono, ya que el ATP se hidroliza para dar lugar a AMP en la reacción HS-4. La asimilación de carbono con una planta C_4 por lo tanto consume un total de cinco moléculas de ATP por átomo de carbono, en lugar de las tres consumidas en las plantas C_3. En un ambiente en el que aumente la actividad oxigenasa de la rubisco, sin embargo, la energía necesaria para prevenir la formación de fosfoglicolato puede ser mucho menor que la energía que de lo contrario se podría perder a través de la fotorrespiración.

La eficiencia de la fotosíntesis de una planta C_4 expuesta a una luz del sol intensa, cuando las temperaturas exceden aproximadamente los 30°C, puede ser el doble que la de una planta C_3. Aunque que la mayor eficacia se debe en parte a la reducción de la fotorrespiración en las plantas C_4 y a su incremento en las plantas C_3, también son importantes otros factores. En una planta C_3, la fotosíntesis está a menudo restringida por la baja concentración atmosférica de dióxido de carbono y no por la disponibilidad de la luz solar. En una planta C_4, sin embargo, el ciclo de Hatch-Slack concentra activamente el dióxido de carbono en las células de la vaina del haz, donde se localiza el ciclo de Calvin, permitiendo que la planta se aproveche de los niveles altos de iluminación.

El enriquecimiento en dióxido de carbono en la vecindad de la rubisco mediante el ciclo de Hatch-Slack otorga una ventaja adicional a las plantas C_4. Debido a que la PEP carboxilasa es un eliminador eficiente del dióxido de carbono, el intercambio de gases a través de los estomas de las plantas C_4 se puede reducir sustancialmente para ahorrar agua sin afectar desfavorablemente a la eficiencia de la fotosíntesis. Como resultado, las plantas C_4 son capaces de asimilar más del doble de carbono que las plantas C_3 por cada unidad de agua transpirada. Esta adaptación hace que las plantas C_4 la sean adecuadas para las regiones con sequías periódicas, como son las sabanas tropicales.

Aunque menos del 1% de las especies de plantas investigadas dependen del ciclo de Hatch-Slack, esta vía tiene especial interés ya que varias especies con importancia económica pertenecen a este grupo. Además, las plantas C_4 como el maíz y la caña de azúcar se caracterizan por un índice fotosintético neto que frecuentemente es dos o tres veces el de plantas C_3 como los cereales. No es sorprendente entonces que los fisiólogos, cosechadores y reproductores de plantas han dedicado tanta atención a las especies C_4, y a preguntarse si es posible mejorar la ineficacia relativa de la vía de la fijación del dióxido de carbono de las plantas C_3. Algunos argumentos de los ingenieros genéticos incluso prevén la conversión genética de las plantas C_3 en plantas C_4.

Las plantas CAM minimizan la fotorrespiración y la pérdida de agua abriendo sus estomas sólo de noche

Finalmente, consideraremos la tercera estrategia empleada por algunas plantas para hacer frente a la derrochadora actividad oxigenasa de la rubisco. Ciertas especies de plantas que viven en el desierto, pantanos salados y otros ambientes donde el acceso al agua está limitado severamente tienen una vía inicial la fijación del dióxido de carbono relacionada estrechamente con ciclo de Hatch-Slack. La secuencia de reac-

ciones es similar, pero estas plantas separan las reacciones de carboxilación y decarboxilación en el *tiempo* más que en el *espacio.* Se denomina **metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM),** debido a que esta vía se descubrió inicialmente en la familia de plantas suculentas conocidas como las crasuláceas. Las plantas que se aprovechan de la fotosíntesis CAM, se llaman **plantas CAM.** La fotosíntesis CAM está presente en aproximadamente el 4% de las especies de plantas investigadas, incluidas muchas suculentas, cactus y orquídeas.

Las plantas CAM, a diferencia de las plantas C_3 y C_4, generalmente abren sus estomas sólo durante la noche, cuando la atmósfera está relativamente fría y húmeda. Ya que el dióxido de carbono difunde hacia las células del mesófilo, éste se asimila mediante los dos primeros pasos de un vía similar al ciclo de Hatch-Slack, y se acumula en forma de malato. Sin embargo, el malato, en vez exportarse desde las células del mesófilo, se almacena en vacuolas grandes, las cuales se hacen muy ácidas. El proceso del movimiento del malato hacia las vacuolas consume ATP, pero es necesario para proteger las enzimas del citosol de una bajada importante en el pH durante la noche.

Las plantas CAM cierran sus estomas durante el día para conservar el agua. El malato difunde entonces desde las vacuolas hacia el citosol, donde continúa el ciclo de Hatch-Slack. El dióxido de carbono liberado por la carboxilación del malato difunde hacia el estroma del cloroplasto, donde se fija de nuevo y se reduce por el ciclo de Calvin. La alta concentración de dióxido de carbono y la baja concentración de oxígeno presentes cuando se dispone de la luz para generar el ATP y el NADPH, favorecen fuertemente la actividad carboxilasa de la rubisco y minimizan la pérdida de carbono a través de la respiración. Fíjese en que la carboxilación de PEP y la decarboxilación del malato ocurren en el mismo compartimiento. Por eso, la actividad de la PEP carboxilasa en las plantas CAM se debe inhibir estrictamente durante el día para evitar que se desarrolle un ciclo inútil.

Las plantas CAM, con sus extraordinarias capacidades para conservar el agua, puede asimilar 25 veces más carbono de una planta C_3 por cada unidad de agua transpirada. Además, algunas plantas CAM exhiben un proceso llamado *funcionamiento CAM, en vacío* a través del cual las plantas mantienen sus estomas cerrados durante el día y la noche. El dióxido de carbono se recicla simplemente entre la fotosíntesis y la respiración, prácticamente sin pérdida de agua. Desde luego, tales plantas no tienen ganancia neta de carbohidratos. Sin embargo, esta capacidad, puede permitirles sobrevivir durante sequías duraderas a lo largo de varios meses.

Perspectiva

La fotosíntesis es el proceso metabólico individual más vital para prácticamente todas las formas de vida en la Tierra, porque en todos nosotros, cualquiera que sean fuentes inmediatas de energía, dependemos en última estancia de la energía radiada del sol. La fotosíntesis implica tanto las reacciones de transducción de energía como de asimilación del carbono. Los fotones de la luz, durante las reacciones de transducción de la energía, se absorben por moléculas de clorofila o por las moléculas de los pigmentos accesorios dentro de la membrana del tilacoide o en la membrana de bacteriana fotosintéticas, y la energía rápidamente se transfire al un par especial de las moléculas de clorofila en el centro de reacción del fotosistema. Allí, la energía se usa para excitar y expulsar un electrón e inducir la separación de cargas. En el caso del fotosistema I de los fotótrofos oxigénicos, este electrón se pasa mediante la ferredoxina al $NADP^+$, generando el NADPH necesario para la fijación y la reducción del dióxido de carbono.

La fuente de electrones en los fotótrofos oxigénicos es el agua. Los electrones se transfieren desde el agua al $NADP^+$ dependiendo de dos fotosistemas que trabajan en serie; el fotosistema II es responsable de la oxidación del agua y el fotosistema I es responsable de la reducción de $NADP^+$. En las plantas, el flujo de electrones entre los dos fotosistemas (o en el modo cíclico alrededor del fotosistema I) pasa a través del complejo citocromo b_6/f, el cual bombea protones hacia el lumen del tilacoide. La fuerza motriz resultante de los protones a través de la membrana del tilacoide se debe en gran parte a la diferencia de pH y se usa para conducir la síntesis de ATP por las partículas CF_1 que sobresalen hacia el exterior de la membrana del tilacoide hacia el estroma del cloroplasto.

En el estroma, el ATP y el NADPH se usan para la fijación y la reducción del dióxido de carbono a formas orgánicas por las enzimas del ciclo de Calvin. En las plantas C_3, el dióxido de carbono se incorpora directamente a la ribulosa-1,5-difosfato mediante la rubisco, generando dos moléculas de 3-fosfoglicerato. En las plantas C_4 y CAM, sin embargo, el dióxido de carbono se fija mediante una vía inicial de carboxilación/decarboxilación que lo concentra dentro de una célula fotosintética —o bien en una célula diferente o en momento diferente a lo largo del día— para la asimilación posterior mediante el ciclo de Calvin.

El producto final de la fijación del dióxido de carbono en cada caso es el gliceraldehído-3-fosfato, el cual se puede convertir en una triosa fosfato secundaria llamada dihidroxiacetona fosfato. Algunas de estas moléculas de triosa fosfato se usan para la biosíntesis de muchos carbohidratos complejos, como la sacarosa, el almidón, o el glucógeno. Otros se usan como fuentes de energía o como esqueleto de carbonos para otras vías metabólicas. El resto se debe usar para regenerar la molécula aceptora con la que comenzó el ciclo de Calvin. La síntesis neta de una molécula de triosa fosfato requiere la fijación de tres moléculas de CO_2 y usa nueve moléculas de ATP y seis moléculas de NADPH. La combinación del flujo cíclico y no cíclico de electrones aseguran que la proporción de ATP y de NADPH dentro de una célula fotosintética cumple con la de-

manda impuesta no sólo para la asimilación del carbono sino también para otras vías, incluyendo aquellas involucradas en la asimilación del nitrógeno y del sulfuro.

La traducción de la energía solar hacia energía química es crucial para la continuidad de la existencia del mundo biológico. Casi toda la energía se almacena en moléculas orgánicas de las que dependen los quimiótrofos, representan la energía de la luz del sol, capturada inicialmente dentro de moléculas de compuestos orgánicos durante la fotosíntesis. Lo que resulta extraordinario de los organismos fotosintéticos es su capacidad para de llevar a cabo la fijación y la reducción del dióxido de carbono neta y de manera continuada usando la energía solar para inducir un proceso altamente endergónico. Sólo los fotótrofos pueden utilizan la luz del sol para extraer electrones desde donadores tan pobres como el agua y usarlos para reducir los átomos de carbono del dióxido de carbono hasta el nivel de un compuesto orgánico. Y lo pueden hacer debido a los acontecimientos fotoquímicos que se inician cuando la luz, con la longitud de onda apropiada, es absorbida por la clorofila, una molécula extraordinaria que ha transformado la biosfera de un planeta entero, la Tierra.

Problemas

Los problemas de mayor dificultad están marcados con un •.

11.1 Verdadero, falso o falta información. Indique si cada uno de los enunciados siguientes son verdaderos (T), falsos (F), o no proporciona suficiente información para poder tomar una decisión (I).

(a) La sacarosa se sintetiza en el estroma del cloroplasto y se exporta desde las células fotosintéticas para proporcionar la energía y el carbono reducido a las células vegetales no fotosintéticas.

(b) El noventa por ciento de la energía solar recogida por el complejo fotosistema se absorbe cuando los fotones inciden sobre un par especial de moléculas de clorofila en el centro de reacción del complejo.

(c) La necesidad energética, expresada como el ATP consumido por molécula de dióxido de carbono fijada, es mayor para una planta C_3 que para una planta C_4.

(d) El mayor donador de electrones para la generación fotosintética del NADPH es siempre el agua.

(e) La enzima rubisco es excepcional en que, dependiendo de las condiciones, muestra dos actividades enzimáticas diferentes.

11.2 La ventaja del ciclo de Hatch-Slack. Una planta C_4 puede ser más eficiente que una planta C_3 para la fijación del dióxido de carbono, una ventaja que comienza a ser más evidente cuando la concentración de dióxido de carbono disminuye.

(a) Explique con sus propias palabras por qué una planta C_4 puede ser intrínsecamente más eficiente que una planta C_3 para la fijación del dióxido de carbono.

(b) ¿Por qué podría ser esta ventaja más obvia a una concentración de dióxido de carbono atmosférico de 0,0035% que a nivel habitual de aproximadamente 0,035%?

(c) Si una planta C_4 y una planta C_3 crecen bajo una iluminación constante en un envase hermético con una concentración inicial de dióxido de carbono de 0,04%, la planta C_4 podría finalmente matar a la planta C_3. Explique por qué.

11.3 El papel de la sacarosa. Una planta usa la energía solar para formar ATP y NADPH, los cuales entonces conducen la síntesis de carbohidratos en las hojas. Al menos un carbohidrato, la sacarosa, se traslada a partes no fotosintéticas (tallos, raíces, flores y frutos) para usarse como fuente de energía. Entonces, El ATP se usa para producir sacarosa, y luego la sacarosa se usa para producir ATP. Podría parecer fácil para la planta solamente producir el ATP y trasladarlo directamente a otras partes de la planta, de ese modo se eliminaría completamente la necesidad del ciclo de Calvin, una vía glicolítica, y el ciclo TCA (y haciendo la vida mucho más fácil a los estudiantes de la biología celular). Sugiera al menos dos razones importantes por las que las plantas no manejan su economía energética de esta forma.

11.4 Efectos de la fotosíntesis. Suponga que tiene una suspensión iluminada de células de *Chorella* llevando a cabo la fotosíntesis en presencia de un 0,1% de dióxido de carbono y un 20% de oxígeno. ¿Cuál podría ser el efecto a corto plazo de los siguientes cambios en las condiciones del nivel de la 3-fosfoglicerato y de la ribulosa-1,5-difosfato? Explique sus respuestas en cada caso.

(a) La concentración de dióxido de carbono se reduce 1000 veces de repente.

(b) La luz se limita a una longitud de onda verde (510-550 mm).

(c) La concentración de oxígeno se reduce desde un 20% a 1%.

11.5 El flujo de energía en la fotosíntesis. Una porción de la energía solar que llega a la superficie de una hoja se convierte finalmente en energía química que aparece en los enlaces químicos de los carbohidratos que se consideran generalmente como los productos finales de la fotosíntesis. Entre los fotones y las moléculas de los carbohidratos, sin embargo, la energía existe en gran variedad de formas. Examine el flujo de energía desde un fotón a través del ATP a una molécula de almidón, considerando la longitud de onda de la luz está en el rango de absorción de uno de los pigmentos accesorios en lugar de la de la clorofila.

11.6 La menta y el ratón. Joseph Priestley, un clérigo Británico, fue una figura importante en los orígenes de la historia de la investigación de la fotosíntesis. En 1771, Priestley escribió estas palabras

> *Uno podría haberse imaginado que ya que el aire común es necesario para la vida vegetal como para la animal, tanto las plantas como los animales se afectan de la misma manera; y yo tuve esa expectativa cuando puse primero una ramita de*

menta dentro de una jarra de cristal que está invertida sobre un contenedor de agua; pero cuando había continuado creciendo allí durante algunos meses, descubrí que el aire ni podría extinguir una vela, ni fue inconveniente para un ratón que puse dentro

Explique la base de las observaciones de Priestley, e indique sus implicaciones para la comprensión general de la naturaleza de la fotosíntesis.

11.7 La reacción Hill. En 1937 se produjo un avance altamente significativo en nuestro entendimiento de la fotosíntesis, cuando Robert Hill mostró que los cloroplastos aislados, aunque no son capaces de fijar dióxido de carbono, eran capaces de producir oxígeno molecular. Esto sólo ocurría si los cloroplastos se iluminaban y se proveían de un aceptor de electrones artificial (el aceptor elegido fue ferricianida). ¿Cuáles de los siguientes enunciados son conclusiones válidas a partir del experimento de Hill? Pueden ser correctas todas, algunas o ninguna.

(a) El oxígeno generado durante la fotosíntesis aparentemente no procede del dióxido de carbono, como se creía en un principio.

(b) Estos descubrimientos estaban de acuerdo con una propuesta hecha seis años antes por Cornelius B. van Niel en la que se indicaba que el oxígeno que se produce durante la fotosíntesis procedía del agua.

(c) La Reacción 11.2 puede ser menos indicativa de lo que ocurre durante la fotosíntesis en los fotótrofos eucariotas si se restasen tres moléculas de agua de cada lado de la reacción.

11.8 La eficacia de la fotosíntesis. En este capítulo se estimó que la eficacia máxima de la fotosíntesis para la conversión de la luz roja, el dióxido de carbono y el agua a gliceraldehído. Un organismo fotosintético, bajo condiciones de laboratorio, *puede* convertir el 31% de la energía luminosa incorporándola en la energía de los enlaces químicos de las moléculas orgánicas. En realidad, sin embargo, la eficacia fotosintética es mucho menor, próxima a un 5% o menos. Considerando que una planta crece en un medio ambiente natural, sugiera cuatro razones para esta discrepancia.

11.9 La estructura del cloroplasto. ¿Dónde se encuentran las siguientes sustancias o procesos en un cloroplasto? Sea tan específicos como sea posible.

(a) Ferredoxina-NADP$^+$ reductasa.

(b) Flujo de electrones cíclico

(c) Síntesis de almidón

(d) Complejo recolector de luz I

(e) Plastoquinol

(f) Bomba de protones

(g) P700

(h) Reducción del 3-fosfoglicerato

(i) Moléculas de carotenoides

(j) Complejo formador de oxígeno

11.10 Transporte de metabolitos a través de las membranas. Para cada uno de los siguientes metabolitos, indique si podría esperar que estuviese sometido a un flujo estable a través de una o más membranas en un cloroplasto activo fotosintéticamente y, si es así, indique qué membrana(s) debe atravesar el metabolito.

(a) CO_2

(b) P_i

(c) Electrones

(d) Almidón

(e) Gliceraldehído-3-fosfato

(f) NADPH

(g) ATP

(h) O_2

(i) Protones

(j) Piruvato

11.11 El Metabolismo del ácido crasuláceo. Una planta CAM usa una vía muy similar al ciclo de Hatch-Slack para la fijación preliminar del dióxido de carbono. Exponga el flujo de carbono desde la atmósfera hasta el gliceraldehído-3-fosfato dentro de una planta CAM. ¿Cómo minimiza esto la pérdida de agua en estas plantas?

•11.12 La teoría endosimbionte. La teoría endosimbionte sugiere que las mitocondrias y los cloroplastos evolucionaron a partir de una bacteria primitiva que fue ingerida por células primitivas nucleadas. Los biólogos han propuesto que la endosimbiosis conduce a la evolución de otras estructuras celulares, tales como los flagelos y los peroxisomas, también. Durante cientos de millones de años, la bacteria ingerida perdió las características no esenciales para la supervivencia dentro de la célula huésped.

(a) Indique para cada uno de los sistemas de membranas encontrados en la mitocondria (dos sistemas) y de los cloroplastos (tres sistemas) si surgió desde una bacteria ingerida o desde el huésped nucleado, basándose en lo que ha aprendido sobre los sistemas de membranas de los orgánulos. Explique su razonamiento.

(b) Describa una estructura o proceso metabólico del que las bacterias púrpureas podrían haber prescindido una vez que se volvieron endosimbiontes dentro de una célula eucariota. ¿Cómo podría la pérdida de esta característica evitar que las bacterias vivieran fuera del huésped?

(c) Describa una estructura o proceso metabólico del que las cianobacterias podrían haber prescindido una vez que se volvieron endosimbiontes dentro de una célula eucariota. ¿Cómo podría la pérdida de esta característica evitar que las bacterias vivieran fuera del huésped?

(d) Los peroxisomas, a diferencia de las mitocondrias y los cloroplastos, apenas se parecen a los organismos que viven libremente. Describa tres características que la mitocondria conserva pero que aparentemente han perdido los peroxisomas durante cientos de millones de años, asumiendo que los peroxisomas evolucionaron a partir de bacterias ingeridas. Describa una ventaja que los peroxisomas podrían haber otorgado a las células nucleadas primitivas.

Bibliografía recomendada

Las referencias con importancia histórica están marcadas con •.

Referencias generales

Aro, E-M. y B. Andersson, eds. *Regulation of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and Respiration*, Vol. 11. Kluwer Academic Publishers, 2001.

Hall, D. O. y K. K. Rao. *Photosynthesis,* 6th ed. New York: Cambridge University Press, 1999.

Leegood, R. C., T. D. Sharkey y S. von Caemmerer, eds. *Photosynthesis: Physiology and Metabolism. Advances in Photosynthesis*, Vol. 9. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000.

El cloroplasto

Flügge, U. I. y H. W. Heldt. Metabolite translocators of the chloroplast envelope. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42 (1991): 129.

Trissl, H. W. y C. Wilhelm. Why do thylakoid membranes from higher plants form grana stacks? *Trends Biochem. Sci.* 18 (1993): 415

Transducción de energía fotosintética

Chitnis, P. R. Photosystem I: Function and Physiology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52 (2001): 593.

•Deisenhofer, J. y H. Michel. The photosynthetic reaction center from the purple bacterium *Rhodopseudomonas viridis. Science* 245 (1989): 1463.

Diner, B. A. y F. Rappaport. Structure, dynamics, and energetics of the primary photochemistry of photosystem II of oxygenic photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53 (2002): 551.

Nugent J. H. Oxygenic photosynthesis. Electron transfer in photosystem I and photosystem II. *Eur. J. Biochem.* 237 (1996): 519.

El ciclo de Calvin y la síntesis de carbohidratos

•Calvin, M. The path of carbon in photosynthesis. *Science* 135 (1962): 879.

Hartman, F. C. y M. R. Harpel. Structure, function, regulation, and assembly of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Annu. Rev. Biochem.* 63 (1994): 197.

Nevins, D. J. Sugars: Their origin in photosynthesis and subsequent biological interconversions. *Am. J. Clin. Nutr.* 61(1995): 915S.

Portis, A. R. Jr. Rubisco activase—Rubisco's catalytic chaperone. *Photosynth. Res.* 75 (2003): 11.

•Schnarrenberger, C. y W. Martin. The Calvin cycle: A historical perspective. *Photosynthetica* 33 (1997): 331.

Fotorrespiración, plantas C4 y plantas CAM

Cushman, J. C. y H. J. Bohnert. Crassulacean acid metabolism: Molecular genetics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50 (1999): 305.

Drake, B. G. y M. A. Gonzàlez-Meler. More efficient plants: A consequence of rising atmospheric CO_2? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48 (1997): 609.

•Hatch, M. D. C_4 photosynthesis: An unlikely process full of surprises. *Plant Cell Physiol.* 33 (1992): 333.

Matsuoka M., R. T. Furbank, H. Fukayama y M. Miyao. Molecular engineering of C_4 photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52 (2001): 297.

Sage, R. F. y R. K. Monson. *C_4 Plant Biology.* San Diego: Academic Press, 1998.

Wingler, A., P. J. Lea, W. P. Quick y R. C. Leegood. Photorespiration: Metabolic pathways and their role in stress protection. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 355 (2000): 1517.

Cuadro de texto 11 A: la teoría endosimbionte

Margulis, L. *Symbiosis in Cell Evolution,* 2nd ed. New York: Freeman, 1993.

Schenk, H. E. A., R. G. Herrmann, K. W. Jeon, N. E. Müller y W. Schwemmler, eds. *Eukaryotism and Symbiosis.* Berlin: Springer-Verlag, 1997.

Tibor, V., K. Takács y G. Vida. A new aspect to the origin and evolution of eukaryotes. *J. Mol. Evol.* 46 (1998): 499.



12

Comportamientos intracelulares: retículo endoplásmico, complejo de Golgi, endosomas, lisosomas y peroxisomas

El estudio de las células eucariotas pasa por la comprensión de una serie de orgánulos intracelulares de membrana, que llevan a cabo diferentes actividades celulares. Entre ellas se encuentran el almacenamiento y la transcripción de información genética, la síntesis de proteínas de secreción, la hidrólisis de ácidos grasos de cadena larga y muchos otros procesos metabólicos propios de las células eucarióticas, que tienen lugar en cada orgánulo. Además de esto, es esencial que el intercambio de moléculas entre los orgánulos, conocido como *tráfico*, esté regulado de forma muy precisa, para asegurar que cada orgánulo recibe los componentes apropiados a su estructura y función. Así pues, el conocimiento del papel de las membranas intracelulares y de la compartimentación de funciones, es básico en el estudio de las células eucariotas.

En el Capítulo 4 describimos brevemente los principales orgánulos de las células eucariotas y, posteriormente, en los Capítulos 10 y 11 nos ocupamos de las mitocondrias y los cloroplastos. Estamos ahora en disposición de considerar en detalle otros orgánulos. Aquí nos centraremos en los que aparecen destacados en la Figura 12.1. Comenzaremos con el *retículo endoplásmico rugoso* y *liso* y con el *complejo de Golgi*, que son los lugares de síntesis, procesamiento y distribución de proteínas. Luego analizaremos los lisosomas y los endosomas. Los *endosomas tempranos* y *tardíos* son orgánulos esenciales en el transporte y distribución de los materiales que la célula toma por endocitosis, así como en la maduración de los *lisosomas*, que son los orgánulos responsables de la digestión celular, tanto de sustancias extracelulares, como de los componentes intracelulares superfluos o dañados. Para terminar discutiremos la colección de funciones propias de los *peroxisomas*, en los que tienen lugar reacciones químicas que generan peróxidos y que son, además, esenciales en la oxidación de ácidos grasos y en la síntesis de ciertos lípidos de membrana.

Cuando estudiemos estos orgánulos, tendremos presente que el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, los endosomas y los lisosomas (pero no los peroxisomas), pertenecen al denominado **sistema de endomembranas** de las células eucariotas. La *envuelta nuclear*, que se analizará en el Capítulo 18, es también parte de este sistema. Como se puede apreciar en la Figura 12.1, la membrana externa de la envuelta nuclear es continua con la membrana del retículo endoplásmico y el espacio perinuclear, limitado por las dos membranas de la envuelta, se continúa con el espacio del retículo endoplásmico, conocido como *luz* o *lumen* del RE. A resultas de esto, las moléculas difunden libremente entre estos compartimientos. El material también puede fluir desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi, los endosomas y los lisosomas, por medio de *vesículas de intercambio*, que actúan de lanzaderas entre diferentes orgánulos. Tales vesículas portan lípidos y proteínas de membrana, así como moléculas solubles. En suma, los orgánulos y las vesículas que los conectan, forman un sistema único de membranas y espacios internos, a servicio del metabolismo celular, como veremos en breve.

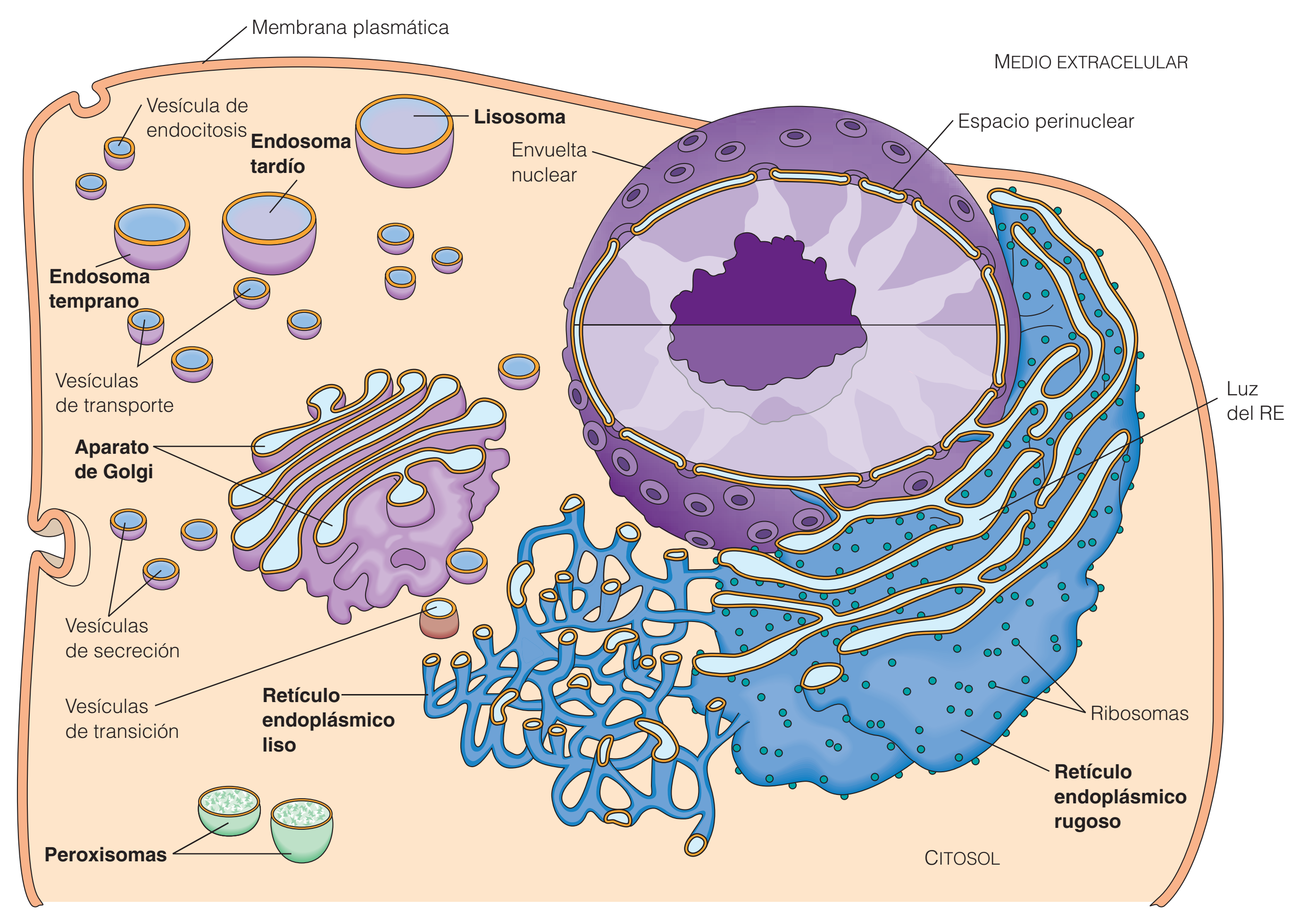


Figura 12.1 **Estructuras celulares analizadas en este capítulo.** Esta lección se centra en el estudio del retículo endoplásmico, el complejo de Golgi y los peroxisomas, incluyendo también referencias a la envuelta nuclear y a la membrana plasmática. El espacio perinuclear entre las dos membranas de la envuelta nuclear es contiguo con el interior del retículo endoplásmico. Éste, a su vez, está relacionado con los espacios internos del complejo de Golgi, de los endosomas y de los lisosomas, gracias a las vesículas que se intercambian entre ellos. Este conjunto de membranas y espacios internos (excluyendo a los peroxisomas) constituyen el denominado sistema de endomembranas de las células eucariotas; el resto del citoplasma se denomina citosol.

El retículo endoplásmico

El **retículo endoplásmico** (**RE**) es una red continua de sacos aplanados, túbulos y vesículas, que se distribuye por todo el citoplasma de las células eucariotas. Su nombre aunque pueda sonar rimbombante, es muy descriptivo. *Endoplásmico* significa «dentro del plasma» (de la célula) y retículo, del latín *reticulum*, significa red pequeña. Los sacos se denominan **cisternas del RE** y el espacio es conocido como **luz** o **lumen** del RE. En una célula típica de mamífero, del 50 al 90% del componente membranoso está representado por el RE. Pese a todo, y a diferencia de otros orgánulos, como las mitocondrias o los cloroplastos, el RE no es visible con el microscopio óptico, a menos que sea teñido con un colorante o un fluoróforo.

El RE se describió por primera vez a finales del siglo XIX, cuando se observó que en algunas células eucariotas, especialmente en las secretoras, aparecían regiones con gran afinidad por los colorantes básicos. Dichas regiones se denominaron con el nombre genérico de *ergastoplasma*, cuyo significado permaneció oscuro hasta los años 50, con el advenimiento de la microscopía electrónica. De esta forma, los biólogos celulares reconocieron la red elaborada de membranas del RE e iniciaron la investigación de su papel en los procesos celulares. Ésta es una situación frecuente en los descubrimientos científicos: los progresos en el conocimiento ocurren, a menudo, a remolque de los progresos tecnológicos en campos afines, o incluso no relacionados directamente. Más recientemente, los avances en la tecnología de microchip y en técnicas de *proteómica* —el estudio in vitro de las interacciones proteína-proteína— ha arrojado más luz al conocimiento de la estructura y función del RE.

Hoy en día se sabe que las enzimas presentes en el RE son responsables de la síntesis de proteínas que se incorporan en el propio RE, el complejo de Golgi, los endosomas, los lisosomas y la membrana plasmática. En el RE se sinte-

tizan también las proteínas que serán segregadas por la célula. Asimismo, el RE es pieza clave en la biosíntesis de lípidos, incluyendo a los triglicéridos, el colesterol y compuestos relacionados. El RE es la fuente de la mayoría de los lípidos que forman parte de las membranas intracelulares y de la membrana plasmática.

Los dos tipos básicos de retículo endoplásmico difieren en estructura y función

Los dos tipos de retículo endoplásmico propios de las células eucariotas, se distinguen por la presencia o ausencia de ribosomas anclados en la cara externa de su membrana (Figura 12.2). El **retículo endoplásmico rugoso** (**RE rugoso**) tiene ribosomas unidos en la cara citósólica (externa) de su membrana (Figura 12.2a). Los ribosomas contienen RNA, responsable de la intensa tinción con colorantes básicos usados para identificar el ergastoplasma, hoy día reconocido como RE rugoso. Un territorio específico del RE, los **elementos de transición** (**ETs**), intervienen en la formación de las vesículas de transición, que exportan lípidos y proteínas hacia el aparato de Golgi. El **retículo endoplásmico liso** (**RE liso**) tiene tal apariencia por la ausencia de ribosomas en su membrana (Figura 12.2b).

Ambos retículos pueden distinguirse, además, por su morfología. Como se ve en la Figura 12.1, las membranas del RE rugoso forman, en general, sacos aplanados, mientras que las del RE liso tienden a formar túbulos. Los elementos de transición del RE rugoso constituyen una excepción a esta regla, y a menudo recuerdan al RE liso. La presencia o ausencia de ribosomas, refleja la diferencia funcional entre los dos tipos de retículos de las células eucariotas. En todo caso, no son orgánulos independientes; la microscopía electrónica demuestra la continuidad entre las luces de ambos. Así, los materiales pueden viajar entre el RE liso y el rugoso, sin necesidad de vesículas de transporte.

Los dos tipos de retículo están presentes en la mayoría de las células eucariotas, si bien su volumen varía considerablemente en función de la actividad celular. Las células que llevan a cabo una importante actividad de síntesis de proteínas, suelen tener una red muy desarrollada de retículo rugoso. Por otra parte, en las células que producen hormonas esteroídicas, hay un claro predominio del RE liso.

Cuando se homogeneiza un tejido para obtener fracciones subcelulares, las membranas del RE suelen romperse en pequeños fragmentos, que se cierran espontáneamente en vesículas denominadas **microsomas**. Cuando los microsomas son sometidos a centrifugación diferencial, se puede aislar una fracción sin y otra con ribosomas, que reflejan su lugar de procedencia. Este tipo de preparación es extremadamente útil para el estudio de las dos variedades de RE. Téngase presente que los microsomas no existen en las células, sino que son artefactos de la técnica. En el Anexo 12A se facilita información detallada al respecto de la fragmentación subcelular por centrifugación diferencial.

El RE rugoso está implicado en la síntesis y procesamiento de proteínas

Los ribosomas unidos a la cara citosólica de la membrana del RE rugoso, son los responsables de la síntesis de proteínas, tanto solubles, como de membrana. Estas proteínas suelen incorporarse en los sistemas de endomembranas y en la membrana plasmática, o bien son exportadas como productos de secreción.

¿Cómo entran las proteínas en el sistema de endomembranas? Muchas de ellas son descargadas hacia la luz del RE rugoso durante su propia síntesis (inserción cotraslacional). Después de la biosíntesis las proteínas de membrana quedan ancladas a la membrana del retículo por sus regiones hidrófobas o por uniones covalentes de lípidos de membrana. Las proteínas solubles y la mayoría de las proteínas



(a) Retículo endoplásmico rugoso

(b) Retículo endoplásmico liso 0,5 μm

Figura 12.2 Retículo endoplásmico liso y rugoso. (**a**) Micrografía electrónica del retículo endoplásmico. El RE rugoso está salpicado con ribosomas (TEM). (**b**) Micrografía electrónica del retículo endoplásmico liso (TEM).

La centrifugación: una técnica imprescindible en biología celular

La **centrifugación** es una técnica insustituible para el aislamiento y purificación de orgánulos y macromoléculas. Este método se basa en el hecho de que cuando una partícula se somete a una fuerza centrífuga, su velocidad de desplazamiento en una disolución dada, depende del *tamaño* y *densidad* de la partícula, así como de la viscosidad y densidad de la solución. Cuanto mayor y más densa sea la partícula, mayor es la **velocidad de sedimentación**, o de movimiento por la solución. Puesto que la mayoría de los orgánulos y macromoléculas difieren sustancialmente unos de otros en tamaño o densidad, centrifugando una mezcla de componentes de la célula, se separarán, o resolverán, los de migración más rápida de los más lentos. Este procedimiento se conoce como **fraccionamiento subcelular** y permite a los investigadores aislar y purificar orgánulos específicos y macromoléculas, para su posterior manipulación y estudio.

En 1974 Albert Claude, George Palade y Christian de Duve compartieron el Premio Nobel, por sus trabajos pioneros en la centrifugación y fraccionamiento subcelular. Claude desempeñó un papel esencial en el desarrollo de la centrifugación diferencial, como método de aislamiento de orgánulos. Palade estuvo presto a usar esta técnica en el estudio del retículo endoplásmico y complejo de Gogi, estableciendo las funciones de estos orgánulos en la biosíntesis, procesamiento y secreción de proteínas. De Duve, por su parte, descubrió dos nuevos orgánulos —lisosomas y peroxisomas—. El descubrimiento de los lisosomas por de Duve se basó en la *centrifugación diferencial*, mientras que su descubrimiento de los peroxisomas, analizados en este capítulo, se apoyó en la *centrifugación en equilibrio de densidad*. Además de la centrifugación diferencial y la de equilibrio de densidad, la *centrifugación en gradiente de densidad* se emplea habitualmente para resolver orgánulos. Estas dos últimas técnicas son también usadas para separar macromoléculas, como ácidos nucleicos y proteínas. Analizaremos cada una de ellas, empezando con una consideración general de las centrífugas y la preparación de las muestras.

Centrífugas

Una centrífuga está formada, básicamente, por un rotor —a menudo confinado en una cámara refrigerada— impulsado por un motor eléctrico. El rotor está unido al soporte de los tubos que contienen las soluciones o suspensiones de partículas a fraccionar. Existen dos tipos principales de rotores: *rotores de ángulo fijo*, en los que los tubos se mantienen con un determinado ángulo (Figura 12A.1a) y *rotores flotantes*, que permiten que los tubos alcancen la posición horizontal, como consecuencia del giro del rotor (Figura 12A.1b). Para centrifugar a alta velocidad —por encima de 20.000 revoluciones por minuto (rpm)— se requiere una **ultracentrífuga** equipada con un sistema de vacío para reducir la fricción (entre el rotor y el aire) y con una jaula de protección alrededor de la cámara, por si se produjera un accidente. Algunas ultracentrífugas giran a unas 100.000 rpm, sometiendo

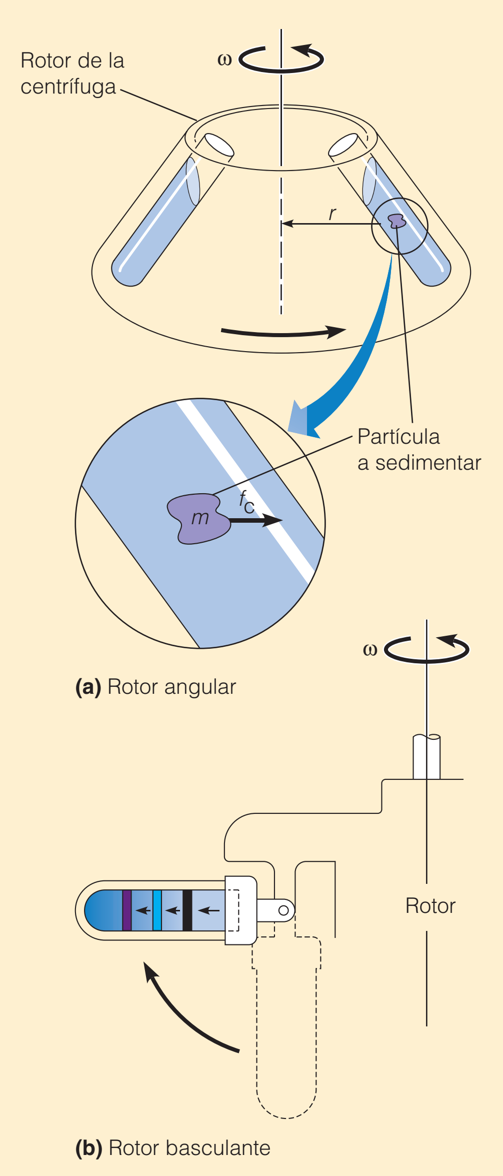


Figura 12.A1 Rotores de centrífuga. Los rotores de centrífuga (**a**) pueden mantener a los tubos con un ángulo fijo (**b**) o bien tener un cabezal basculante, que permite al tubo alcanzar la posición paralela a la dirección de la fuerza centrífuga.

a las muestras a fuerzas 500.000 veces mayores que la fuerza de gravedad (*g*).

Preparación de las muestras

Los tejidos deben ser homogeneizados antes de que los componentes celulares puedan ser separados por centrifugación. Para preservar la integridad de los orgánulos, la **homogeneización** se hace, habitualmente, en una solución isotónica fría, como sacarosa 0,25 *M*. La ruptura de las células puede conseguirse haciéndolas pasar por un orificio estrecho,

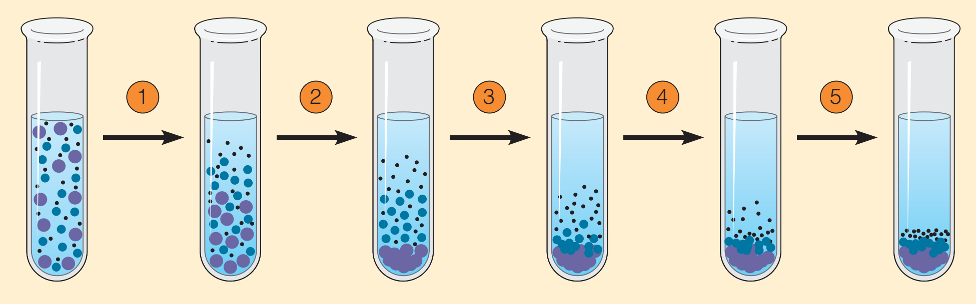


Figura 12.A2 Centrifugación diferencial. Esta centrifugación permite separar partículas en base a sus diferencias en la velocidad de sedimentación, que refleja, a su vez, diferencias en tamaño o densidad. Se ilustra aquí la técnica para tres partículas que difieren significativamente en tamaño. Las partículas, que forman parte de un homogeneizado inicial, se someten sucesivamente a cinco centrifugaciones iguales (números encerrados en círculos). Las partículas grandes o densas (esferas moradas), sedimentan rápidamente, las de tamaño o densidad intermedias (esferas azules), sedimentan algo más lentamente y las menores o de más baja densidad (esferas negras), sedimentan muy lentamente. Finalmente todas las partículas alcanzarán el fondo del tubo, a menos que el proceso se interrumpa pasado un cierto tiempo.

sometiendo al tejido a vibración ultrasónica, por choque osmótico o manualmente, con mortero y almirez. El **homogeneizado** resultante es una suspensión de orgánulos, pequeños componentes celulares y moléculas. Si el tejido se homogeneiza con suficiente suavidad, la mayoría de los orgánulos y otras estructuras permanecen íntegros, reteniendo sus propiedades bioquímicas originales.

Centrifugación diferencial

La **centrifugación diferencial** permite separar orgánulos en función de su tamaño o densidad. Como se indica en la Figura 12A.2, las partículas mayores o más densas (esferas moradas), sedimentan rápidamente, las de tamaño o densidad intermedio (esferas azules), sedimentan a una velocidad intermedia y las más pequeñas o de menor densidad (esferas negras), sedimentan lentamente.

Podemos expresar el tamaño relativo de un orgánulo o macromolécula en términos de **coeficiente de sedimentación**, una medida de la velocidad a la que sedimenta una partícula, cuando es sometida a centrifugación. El coeficiente de sedimentación se expresa en **unidades Svedberg** (S), en reconocimiento a Theodor Svedberg, el químico sueco que desarrolló la ultracentrífuga, entre 1920 y 1940. En la Figura 12A.3 se indican los coeficientes de sedimentación de algunos orgánulos, macromoléculas y virus.

(continúa)

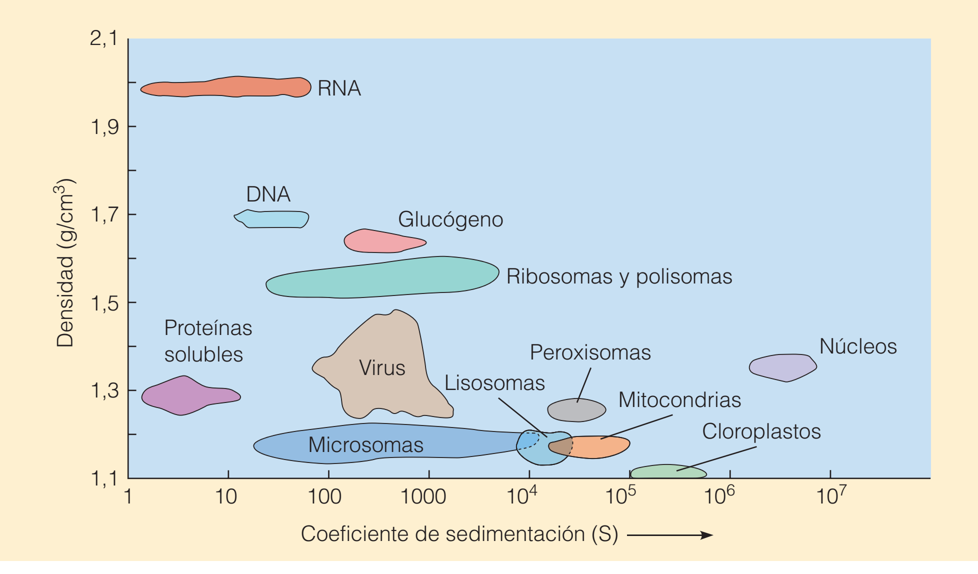


Figura 12.A3 Coeficientes de sedimentación de orgánulos, macromoléculas y virus. El coeficiente de sedimentación de una partícula, expresado en unidades Svedberg (S), indica cuán rápidamente sedimentará cuando sea sometida a una fuerza centrífuga. Los valores altos de S indican una mayor velocidad de sedimentación. La densidad de una partícula (expresada en g/cm^3), determina qué banda alcanzará cuando sea sometida a centrifugación en equilibrio de densidad. (*Véase* el Problema 12.11.)

La Figura 12A.4 ilustra un ejemplo de la centrifugación diferencial. Primero se homogeneiza el tejido de interés ①. Luego se procede al aislamiento de las fracciones subcelulares, sometiendo al homogeneizado y subsiguientes sobrenadantes a centrifugaciones sucesivas, que van aumentando en intensidad y duración (②-⑤). El sobrenadante es la suspensión de aspecto más claro que queda después de que las partículas, de un tamaño y densidad dadas, hayan sido retiradas en forma de perla («**pellet**»), después de cada centifugación. En cada caso, el sobrenadante se decanta, o pipetea, sobre un nuevo tubo de centrifugación y se vuelve a centrifugar, con mayor fuerza, para obtener el siguiente pellet. En las sucesivas etapas, los pellets están enriquecidos en: núcleos, células enteras y restos ②; mitocondrias, lisosomas y peroxisomas ③; RE y otros fragmentos de membrana ④ y ribosomas libres y macromoléculas grandes ⑤. El material de cada pellet puede resuspenderse y usarse para estudios al microscopio electrónico o bioquímicos. El último sobrenadante, denominado *citosol*, está formado principalmente por componentes celulares solubles.

Cada fracción obtenida está enriquecida en los respectivos orgánulos, pero también están parcialmente contaminadas con otros orgánulos y componentes celulares. A menudo, la mayoría de los contaminantes del pellet pueden eliminarse, resuspendiéndolos en una solución isotónica y centrifugando de nuevo.

Centrifugación en gradiente de densidad

En el ejemplo precedente de centrifugación diferencial, las partículas a separar estaban uniformemente distribuidas en la solución, antes de la centrifugación. La centrifugación en **gradiente de densidad** (o **zonal**) es una variante de la anterior, en la que la muestra a fraccionar se extiende como una fina capa sobre la superficie de un *gradiente de soluto*. El gradiente se consigue con concentraciones crecientes del soluto —y por tanto de densidad— desde la superficie hasta la base del tubo. Cuando se someten a la fuerza centrífuga, las partículas que difieren en tamaño o densidad, se desplazan hacia abajo, en bandas o *zonas* discretas, que emigran con una tasa diferente. Debido al gradiente del soluto, las partículas, conforme emigran, van encontrando soluciones ligeramente más densas, que las van frenando. Como resultado, cada zona queda bien definida, maximizando la resolución de las partículas.

El proceso se muestra en la Figura 12A.5. Las partículas grandes o densas (moradas) encuentran su banda rápidamente, las de tamaño o densidad intermedio (azules), sedimentan más lentamente y las más pequñas (negras), lo hacen lentamente. La centrifugación debe detenerse después de que las bandas de interés hayan emigrado lo suficiente como para ser resueltas, pero *antes* de que cualquiera de las bandas alcance el fondo del tubo. Pararla en este punto es esencial, pues todas las partículas son más densas que la solución del tubo, incluso que la de más

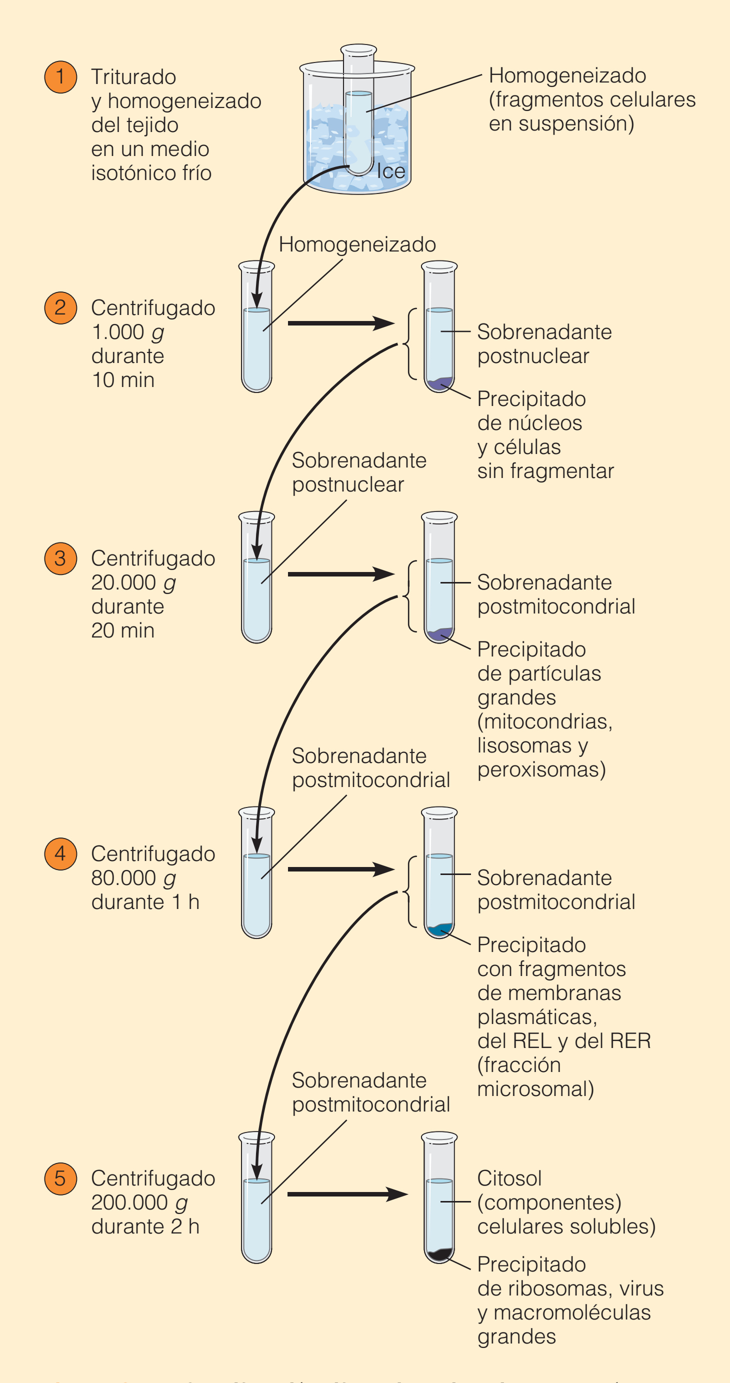


Figura 12.A4 Centrifugación diferencial y aislamiento de orgánulos. Para aislar componentes celulares específicos, se somete al homogeneizado de tejido a varias centrifugaciones. En cada una de ellas se emplea el sobrenadante obtenido en la anterior y se aplica una mayor fuerza *g*, durante más tiempo.

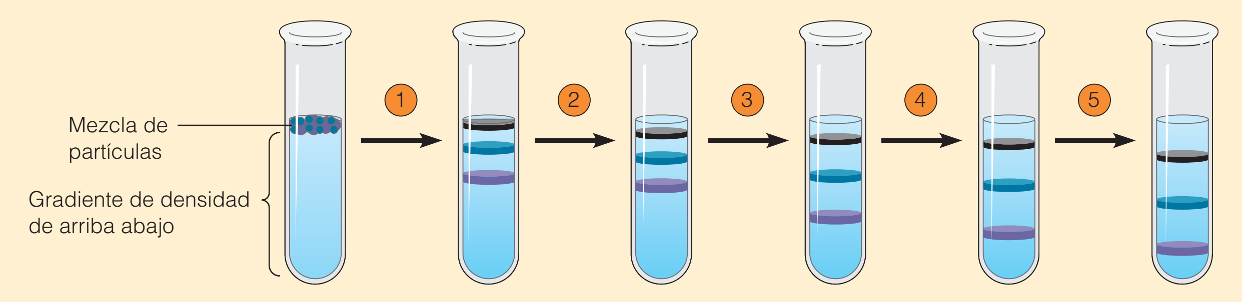


Figura 12.A5 Centrifugación en gradiente de densidad. Al igual que la centrifugación diferencial (*véase* la Figura 12A.2), es una técnica que permite separar partículas en base a diferencias en la velocidad de sedimentación. Aquí, sin embargo, la muestra a fraccionar se dispone en la superficie de un gradiente de soluto cuya densidad aumenta progresivamente desde la parte superior del tubo a la inferior. El ejemplo aquí mostrado es para tres partículas que difieren significativamente en tamaño. Sometidas a cinco centrifugaciones consecutivas de igual fuerza (números encerrados en círculos), las partículas emigran a través del gradiente, en forma de bandas diferentes.

abajo. Si la centrifugación se prolonga demasiado, las bandas van alcanzando, una tras otra, el fondo del tubo, arruinando el verdadero propósito del proceso.

La centrifugación en gradiente de densidad suele utilizarse para separar, tanto orgánulos, como macromoléculas. En la Figura 12A.6 se aprecia la separación de mitocondrias y lisosomas, con esta técnica. El tejido a estudiar se homogeneiza y somete a centrifugación diferencial, para obtener un pellet enriquecido en mitocondrias y lisosomas ①. Posteriormente, se resuspende el pellet en un pequeño volumen de solución isotónica y se coloca sobre un gradiente de soluto, dispuesto en tubo de plástico y cuya concentración crece desde la parte superior al fondo ②.

Durante la centrifugación, las mitocondrias, que son mayores y más densas que los lisosomas, se desplazan por el gradiente, como una banda de sedimentación rápida ③. Después de un tiempo apropiado, se detiene la centrífuga, se pincha la base del tubo y se colectan las *fracciones* ④. Las mitocondrias, que se desplazan más rápidamente que los lisosomas, están más próximas al fondo del tubo y por tanto, se recolectan primero. Los lisosomas aparecerán en fracciones más tardías. Analizando las fracciones con marcadores de enzimas específicas para mitocondrias y lisosomas, se podrán identificar las fracciones, así como el grado de contaminación en cada una de ellas.

Centrifugación en equilibrio de densidad

La **centrifugación en equilibrio de densidad** (o **isopícnica**) es un método muy eficaz para la separación de orgánulos y macromoléculas, basado en diferencias de densidad (Figura 12A.3). Como la centrifugación en gradiente de densidad, en este caso se emplea un gradiente creciente, pero en este caso, la concentración del soluto se encuentra en los valores de densidad de los orgánulos o macromoléculas que se pretenden separar. Para separar orgánulos, suele emplearse un gradiente de sacarosa, establecido entre 1,10 y 1,30 g/cm^3 (0,75-2,3 *M* de sacarosa). Este método también es válido para separar las diferentes formas de DNA y RNA, en base a sus diferentes densidades. Dado que estas macromoléculas son más densas que los orgánulos, el gradiente suele hacerse con sales de metales pesados, como el cloruro de cesio (CsCl). En la figura 19.4 se resume un experimento clásico en el que se emplea un gradiente de cesio para separar DNA dicatenario, que contiene el isótopo^{14}N del que tiene el isótopo ^{15}N, así como DNAs híbridos.

La Figura 12 A.7 describe la separación de orgánulos basada en la centrifugación en equilibrio de densidad. El tejido de interés se homogeneiza y se centrifuga diferencialmente, para obtener un pellet enriquecido en mitocondrias, lisosomas y peroxisomas ①. El pellet se resuspende luego en una solución de sacarosa 0,25 *M* y se dispone sobre un gradiente de sacarosa, que abarque las densidades de los tres orgánulos ②. Durante la centrifugación, los orgánulos se desplazan por el gradiente, hasta alcanzar su densidad de *equilibrio* o *flotación* —el punto en el que la densidad de la sacarosa iguala a la densidad del orgánulo— ③. En la densidad de flotación, las fuerzas sobre el orgánulo se anulan y, por tanto, no se desplaza. Pasado un tiempo pertinente, todos los orgánulos alcanzan su densidad de flotación característica, deteniéndose en la correspondiente posición. Cuando se supone que todos los orgánulos han alcanzado el equilibrio, se detiene la centrífuga, se perfora la base del tubo y se colectan las fracciones ④. Dadas sus diferentes densidades, los tres orgánulos se recogen en fracciones diferentes ⑤.

(continúa)

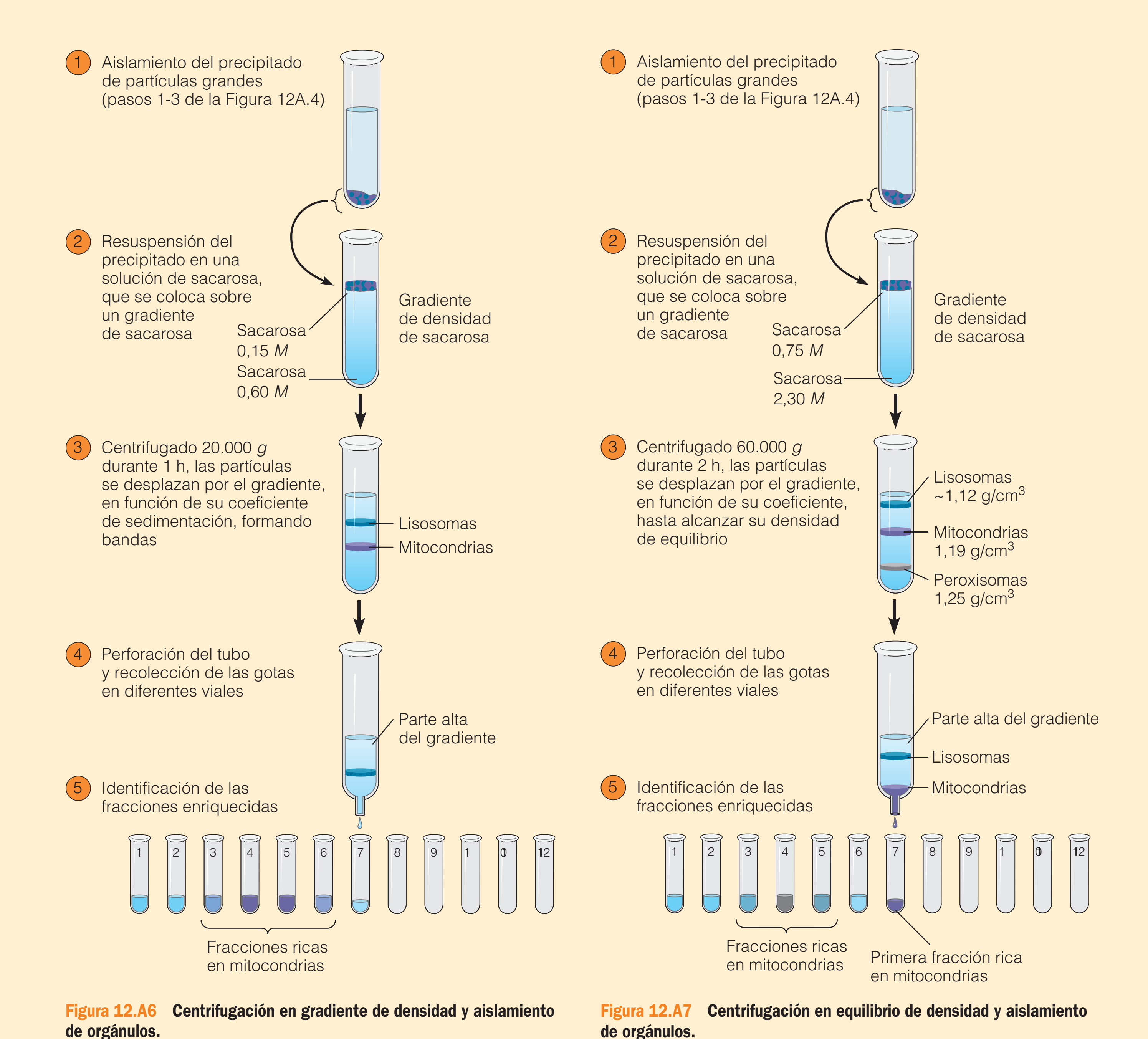


Figura 12.A6 Centrifugación en gradiente de densidad y aislamiento de orgánulos.

Figura 12.A7 Centrifugación en equilibrio de densidad y aislamiento de orgánulos.

de secreción se vierten a luz del RE. Algunas proteínas se incorporan en el retículo después de ser traducidas (inserción postraslacional), circunstancia esta que es la que tiene lugar, de forma generalizada, en los peroxisomas, las mitocondrias y los cloroplastos. En el Capítulo 22 se analizarán en detalle los mecanismos de biosíntesis y distribución de proteínas en el RE.

Además de la síntesis de polipéptidos, el RE es el lugar donde tienen lugar las primeras etapas de adición y procesamiento de los grupos hidrocarbonados de las glicoproteínas, el plegamiento de proteínas, el reconocimiento y eliminación de polipéptidos mal plegados y el ensamblaje de proteínas multiméricas. Como es lógico, la dotación proteica del RE incluye las enzimas que catalizan las modificaciones co- y post-traducción. La glicosilación de proteínas se estudiará en este mismo capítulo. Un ejemplo de proteína implicada en el plegamiento de cadenas polipeptídicas es la *disulfuro isomerasa*, que cataliza la formación y ruptu-

ra de puentes disulfuro entre residuos de cisteína. Como ya estudiamos en el Capítulo 3, la formación de estos enlaces es esencial para el correcto plegamiento de los polipéptidos (*véanse* Figuras 3.5 y 3.7). Volveremos a considerar el plegamiento proteico en el Capítulo 22.

Además de facilitar el plegamiento y ensamblaje de proteínas, el RE es el lugar del control de calidad. Las proteínas que no han sido correctamente modificadas, plegadas o ensambladas, se expulsan del RE en un proceso conocido como *degradación asociada al RE (ERAD).* Antes de que estas proteínas alcancen el aparato Golgi, son degradadas por los *proteasomas* del citosol (*véase* Figura 23.38). Varias enfermedades, entre las que se encuentran la fibrosis quística y la hipercolesterolemia familiar, tienen su origen en defectos en estos procesos.

El RE liso está implicado en la detoxificacion, el metabolismo de hidratos de carbono y otros procesos celulares

El RE liso interviene en múltiples procesos celulares, incluyendo la eliminación de sustancias tóxicas, el metabolismo de hidratos de carbono, el almacenamiento de calcio o la biosíntesis de esteroides. Dentro de esta última categoría, es especialmente importante la síntesis de las hormonas sexuales masculina y femenina y las hormonas esteroídicas de la corteza adrenal.

Detoxificación de fármacos. Una reación común a la mayoría de las rutas de detoxificación y de la biosíntesis de esteroides, es la **hidroxilación**, es decir, la adición de grupos hidroxilo a moléculas orgánicas aceptoras. En cada caso, la hidroxilación depende de un elemento de la familia de proteínas citocromo P-450. Los miembros de esta familia están especialmente bien representados en el RE liso de los hepatocitos (células del hígado), pero aparecen también en los pulmones y en células del intestino. En el RE liso existe un sistema de transporte, que transfiere electrones desde el NADPH o el NADH a una proteína citocromo P450. La forma reducida de la proteína P-450, es ahora capaz de donar un electrón al oxígeno molecular (O_2), permitiendo la hidroxilación de la molécula. La siguiente reacción se muestra esquemáticamente, donde R es el aceptor proteico de hidroxilos, actuando el NADPH, o el NADH, como donante de electrón es:

$$RH + NAD(P)H + H^+ + O_2 \longrightarrow ROH + NAD(P)^+ + H_2O \qquad \textbf{(12.1)}$$

Mientras que el NADH es el donante de electrones para la detoxificación y la síntesis de esteroides, el NADH es el reductor en la hidroxilación de ácidos grasos. Además del NADPH o el NADH, el oxígeno molecular es la otra molécula esecial en las hidroxilaciones. Como se indica en la reacción 12.1, uno de los átomos de la molécula de oxígeno, se usa para hidroxilar al sustrato, mientras que el otro es reducido a agua. Las enzimas que catalizan estas reacciones se denominan *oxidasas de función mixta* o *monooxigenasas.*

La hidroxilación aumenta la solubilidad en agua de la mayoría de las drogas hidrófobas. Esta modificación es crítica, pues la mayoría de los compuestos hidrófobos son solubles en los lipídos de las membranas y son, por tanto, retenidos por el organismo, mientras que los compuestos hidrosolubles se eliminan fácilmente, primero hacia la sangre, y luego hacia el exterior (excreción).

Por ejemplo, la eliminación de barbitúricos aumenta cuando son hidroxilados por las enzimas del RE liso. Esto se puede demostrar inyectando a una rata, el sedante fenobarbital. Uno de los efectos más notables es el rápido aumento de las enzimas detoxificantes de barbitúricos en el hígado, acompañado de una proliferación dramática del RE liso. Análogamene se comprueba que, en las personas administradas regularmente con fenobarbital, se precisan dosis crecientes del mismo, para conseguir los mismos efectos sedativos. Más aún, la especificidad de las oxidasas de función mixta es tan amplia, que pueden hidroxilar y, por tanto solubilizar, a muchos otros agentes útiles, como antibióticos, anticoagulantes y esteroides. El uso crónico de los barbitúricos, tiene como resultado la disminución de la eficacia de los barbitúricos y otros muchos fármacos.

Otro grupo importante de proteínas P-450 propias del RE liso, implicadas también en reacciones de hidroxilación, es el de las enzimas del complejo denominado *hidroxilasa de hidrocarburos de arilo.* Este complejo participa en el metabolismo de *hidrocarburos policíclicos*, que son moléculas orgánicas compuestas por dos o más anillos bencénicos unidos. Si bien la hidroxilación de estas moléculas tóxicas puede ser útil, pues aumenta su solubilidad en agua, los productos oxidados son, a menudo, incluso más tóxicos que los compuestos de partida. Se ha comprobado que la hidroxilasa de hidrocarburos de arilo puede convertir a carcinógenos potenciales en sus formas químicamente activas. Los ratones que expresan niveles elevados de la hidroxilasa, presentan una mayor incidencia en el desarrollo espontáneo de cánceres, que los ratones normales, mientras que los tratados con un inhibidor de la hidroxilasa de hidrocarburos de arilo, desarrollan pocos tumores. Cabe citar aquí, que el humo del tabaco es un potente inductor de la hidroxilasa de hidrocarburos de arilo.

Metabolismo de hidratos de carbono. El RE liso de los hepatocitos está también involucrado en la hidrólisis enzimática del glucógeno, como lo demuestra la presencia de la *glucosa-6-fosfatasa.* La glucosa-6-fosfatasa es una de las enzimas exclusivas de la membrana del RE y se usa, a menudo, como marcador del retículo durante el fraccionamiento celular. Cataliza la liberación del grupo fosfato desde la glucosa-6-fosfato, para formar glucosa libre y fosfato inorgánico (P_i):

$$\text{Glucosa-6-fosfato} + H_2O \longrightarrow \text{glusosa} + P_i \qquad \textbf{(12.2)}$$

Para comprender la importancia de esta fosfatasa, necesitamos recordar primero cómo almacenan el glucógeno las células hepáticas y las razones y mecanismos de su posterior ruptura.

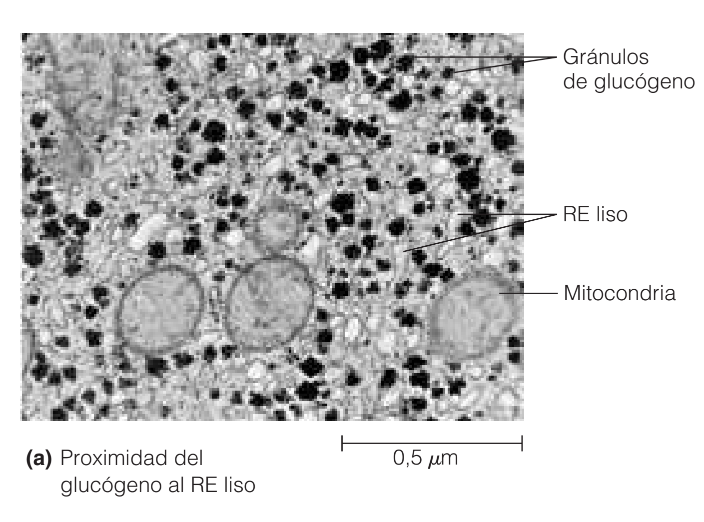
Uno de los papeles principales del hígado es el mantenimiento, relativamente constante, de los niveles de glucosa en sangre. Almacena la glucosa en forma de glucógeno y la libera según la va requiriendo el cuerpo, especialmente entre comidas y como respuesta a la actividad muscular. El glucógeno hepático se almacena en forma de gránulos asociados al RE liso (Figura 12.3a). La liberación del glucógeno hepático está bajo control hormonal (*véase* la Figura 14.24) y precisa de la activación de la *glucógeno fosforilasa*, enzima que rompe al glucógeno en unidades de glucosa-1-fosfato (Figura 12.3b). La glucosa-1-fosfato se convierte fácilmente en el citosol en glucosa-6-fosfato, gracias a la enzima *fosfoglucomutasa.*

Sin embargo, las membranas suelen ser bastante impermeables a los azúcares fosforilados. Para abandonar la célula hepática y entrar en el torrente sanguíneo, la glucosa-6-fosfato debe ser transformada en glucosa libre. La glucosa-6-fosfatasa unida a las membranas del RE, elimina el fosfato, permitiendo a la glucosa salir del hepatocito, gracias a una permeasa (el transportador de glucosa del Capítulo 8; *véase* la Figura 8.8). Una vez en la sangre, se distribuye hacia otras células que necesiten energía. Resulta interesante recordar que la actividad glucosa-6-fosfatasa es propia del hígado, riñón e intestino, faltando en músculo y sistema nervioso. Las células musculares y nerviosas retienen la glucosa-6-fosfato y la emplean para satisfacer sus propias necesidades energéticas.

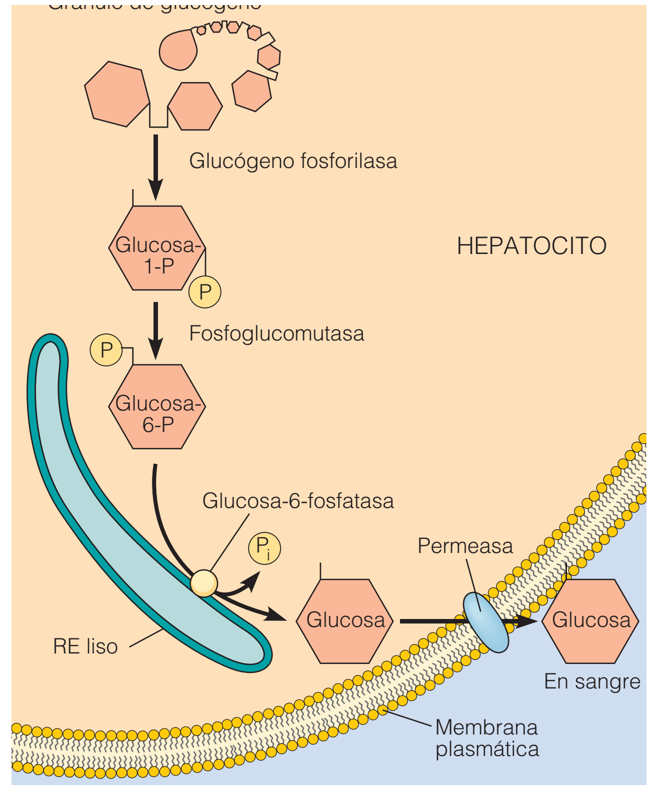
Almacenamiento de calcio. En ciertas células, como las musculares, existen subdominios en el RE liso, especializados en el almacenamiento de iones calcio. En estas células, la luz del RE presenta concentraciones elevadas de proteínas ligantes de calcio. Los iones de calcio son bombeados al interior del RE por *bombas de calcio dependientes de ATP* (ATPasas) y se liberan en respuesta a señales extracelulares (*véase* la Figura 14.12). El *retículo sarcoplásmico* de las células musculares es un ejemplo de RE liso especializado en el almacenamiento de calcio. Las ATPasas de calcio están introduciendo constantemente el ion en el retículo sarcoplásmico. La unión de los neurotransmisores a sus receptores de la superficie de las células musculares, desencadenada una cascada de señalización que culmina con la liberación de calcio y la contracción de las fibras musculares.

El RE desempeña un papel esencial en la biosíntesis de membranas

Los estudios de la biosíntesis de lípidos y los destinos de éstos en las células eucariotas, revelan que el RE es la fuente primaria de lípidos de membrana, incluyendo a los fosfolí-



(a) Proximidad del glucógeno al RE liso



(b) Process of glycogen breakdown in liver

Figura 12.3 Papel del RE liso en el catabolismo hepático del glucógeno. (**a**) En esta micrografía electrónica de una célula hepática de mono, se observan numerosos gránulos de glucógeno en íntima asociación con el RE liso (TEM). (**b**) La degradación del glucógeno se realiza eliminando unidades de glucosa, en forma de glucosa-1-fosfato, que son luego convertidas a glucosa-6-fosfato en el citosol. La liberación del grupo fosfato depende de la glucosa-6-fosfatasa, enzima asociada a la membrana del RE liso. Una vez libre, la glucosa sale hacia la sangre, gracias a una permeasa de la membrana plasmática.

pidos y el colesterol. De hecho, la mayoría de las enzimas que se requieren para la síntesis de varios fosfolípidos de membrana no se encuentran en ninguna otra parte de la célula. Hay, pese a todo, excepciones. Por ejemplo, mientras que las mitocondrias importan desde el RE toda la fosfatidilcolina, el fosfatidilinositol y la fosfatidilserina de sus membranas, tanto externa, como interna, la fosfatidiletanolamina la sintetizan ellas mismas, por descarboxilación de la fosfatidilserina, previamente importada. Otras excepciones significativas son la biosíntesis del colesterol y el dolicol de los peroxisomas y la de los lípidos propios de los cloroplastos, que tiene lugar en dichos orgánulos.

La biosíntesis de los fosfolípidos está restringida a una monocapa de la membrana del RE. Los centros activos de las enzimas implicadas están expuestos hacia el citosol y los lípidos recién sintetizados, se incorporan a la monocapa que mira hacia el citosol. Sin embargo, las membranas celulares son *bicapas* lipídicas, con fosfolípidos en ambos lados. Así pues, debe existir un mecanismo de transferencia de fosfolípidos. Dado que es termodinámicamente desfavorable que los fosfolípidos pasen de forma espontánea, y con una tasa significativa, de un lado al otro de la membrana, la transferencia depende de los **traslocadores de fosfolípidos** o **flipasas**, que catalizan dicha traslocación en las membranas del RE.

Los traslocadores de fosfolípidos, como otras enzimas, son muy específicos y afectan tan sólo a la velocidad del proceso. En definitiva, será la dotación de transportadores disponibles, la que determine qué tipo de fosfolípidos son transferidos. Así pues, la especificidad de los traslocadores contribuye a la *asimetría de la membrana*, descrita en el Capítulo 7. Por ejemplo, la membrana del RE tiene el traslocador de fosfatidilcolina, pero no los de fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol o fosfatidilserina. En consecuencia, la fosfatidil colina aparece distribuida en ambas caras de la membrana del RE, mientras que los otros tres fosfolípidos quedan confinados en la cara citosólica. Cuando las vesículas formadas en el RE se fusionen con otros orgánulos del sistema de endomembranas, esta distribución diferencial establecida en el RE, se transferirá a las otras membranas celulares.

El movimiento de los fosfolípidos desde el RE a las mitocondrias y los cloroplastos, entraña una dificultad añadida. A diferencia de los orgánulos del sistema de endomembranas, las miotocondrias y los cloroplastos no crecen por fusión con vesículas derivadas del RE. En lugar de eso, en el citoplasma existen unas **proteínas de intercambio de fosfolípidos** (o *proteínas de transferencia de fosfolípidos*), que llevan a los fosfolípidos desde la membrana del RE a las membranas externas de las mitocondrias y los cloroplastos. Cada tipo de proteína de intercambio reconoce un tipo específico de fosfolípido, que extrae de una membrana y lo lleva, a través del citosol, a la otra membrana. Esta transferencia contribuye también al movimiento de fosfolípidos desde el RE a otras membranas de la célula, incluyendo a la membrana plasmática.

Aunque el retículo es la fuente de la mayoría de los lípidos de membrana, su composición varía significativamente de la de otras membranas de la célula (Tabla 12.1). Por ejemplo, una carácterística típica de la membrana plasmática de los hepatocitos, es su contenido relativamente bajo de fosfoglicéridos y alto de colesterol, esfingomielina y glicolípidos. Se ha podido comprobar que se produce un aumento progresivo de colesterol en las membranas, durante su progresión desde el RE hacia otros compartimientos y, finalmente, hacia la membrana plasmática. Paralelamente, se registra un gradiente de incremento en el grosor de la membrana. Las membranas del RE tienen un grosor aproximado de unos 5 nm, mientras que la membrana plasmática alcanza los 8 nm. Algunos biólogos creen que el aumento en grosor tiene implicaciones en los fenómenos de clasificación y distribución de proteínas de membrana, que serán discutidos después de que consideremos el aparato de Golgi y el papel que desempeña en el procesamiento de proteínas.

Tabla 12.1 Composición de las membranas del RE y plasmática en hepatocitos de rata

Componentes de la membrana	Membrana del retículo	Membrana plasmática
Peso porcentual de cada componente de membrana, referido al peso total de la membrana		
Carbohidratos	10	10
Proteínas	62	54
Lípidos totales	27	36
Peso porcentual de los lípidos de membrana, referido al total de lípidos		
Fosfatidilcolina	40	24
Fosfatidiletanolamina	17	7
Fosfatidilserina	5	4
Colesterol	6	17
Esfingomielina	5	19
Glicolípidos	trazas	7
Otros lípidos	27	22

El complejo de Golgi

Nos centraremos ahora en el complejo de Golgi, un componente del sistema de endomembranas, íntimamente ligado al RE, tanto física, como funcionalmente. El **complejo de Golgi** (o *aparato de Golgi*) debe su nombre a Camillo Golgi, el biólogo italiano que lo describió por primera vez en 1898. Utilizando tetróxido de osmio para teñir neuronas, notó la presencia de un precipitado del metal, formando una red delicada alrededor del núcleo. Posteriormente se pudo comprobar el mismo tipo de reacción en diferentes tipos celulares y con distintos metales pesados. Pese a todo, los resultados eran inconsistentes y no se pudo identificar ninguna estruc-

tura celular responsable de la tinción. Como consecuencia, la naturaleza —e incluso la propia existencia— del complejo de Golgi, fue muy controvertida hasta los años 50, cuando pudo por fin identificarse, gracias al microscopio electrónico. Desde entonces se ha progresado mucho en la comprensión de la estructura y función del aparato de Golgi, sus relaciones con el RE y su papel en las modificaciones químicas, clasificación y empaquetamiento de las proteínas que recibe, vía vesículas de transición, desde el RE.

El complejo de Golgi está formado por una serie de cisternas

El complejo de Golgi está integrado por una serie de cisternas aplanadas de membrana, con forma de sacos discoidales, apilados como se muestra en la Figura 12.4a. Cada agrupación se denomina **pila de Golgi** (o *dictiosoma*) y fácilmente identificable en el microscopio electrónico (Figura 12.4b). Generalmente hay de 3 a 8 cisternas por cada pila, si bien en algunos casos pueden ser varias docenas. El número y tamaño de los dictiosomas depende del tipo celular y de la actividad metabólica de la célula. Algunas tienen un único gran dictiosoma, mientras que otras —especialmente las muy activas en secreción— poseen centenares, e incluso millares, de apilamientos de Golgi. La luz del complejo de Golgi, es parte de la red de espacios internos del sistema de endomembranas (Figura 12.1).

Vesículas de transporte. La visión estática del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, que resulta de las micrografías electrónicas, como la de la Figura 12.4b, pueden resultar equívocas; estos orgánulos son, en realidad, estructuras muy dinámicas. Tanto el RE como el complejo de Golgi están rodeados de multitud de **vesículas de transporte**, que parten de sus membranas en una región de la célula y se fusionan con otras membranas. Tales vesículas portan lípidos y proteínas desde los elementos de transición del RE al complejo de Golgi, entre las cisternas del propio dictiosoma y desde el complejo de Golgi hasta varios destinos celulares, como los gránulos de secreción, los endosomas y los lisosomas.

La mayoría de las vesículas implicadas en la transferencia de lípidos y proteínas, se consideran *vesículas cubiertas*, debido a la presencia de cubiertas, o capas, de proteínas, que rodean a su cara citoplásmica, a medida que la vesícula se va formando. Las cubiertas son responsables de incurvar a la membrana, facilitando la vesiculación y desaparecen de la vesícula antes de que ésta se fusione con la membrana de destino. La composición de la cubierta depende de la función de cada vesícula en particular. Las proteínas de cubiertas más estudiadas son la *clatrina*, *COPI* y *COPII*. (COP es la abreviatura de «coat protein», en español, proteína de la cubierta.) La presencia de vesículas cubiertas es una característica común en la mayoría de los procesos celulares relacionados con la transferencia o intercambio de sustancias, bien entre los diferentes compartimientos de membrana de una célula eucariota, bien entre el interior y el exterior celular. Analizaremos más tarde en este capítulo, la formación de las vesículas cubiertas y su papel en el transporte de lípidos y proteínas.

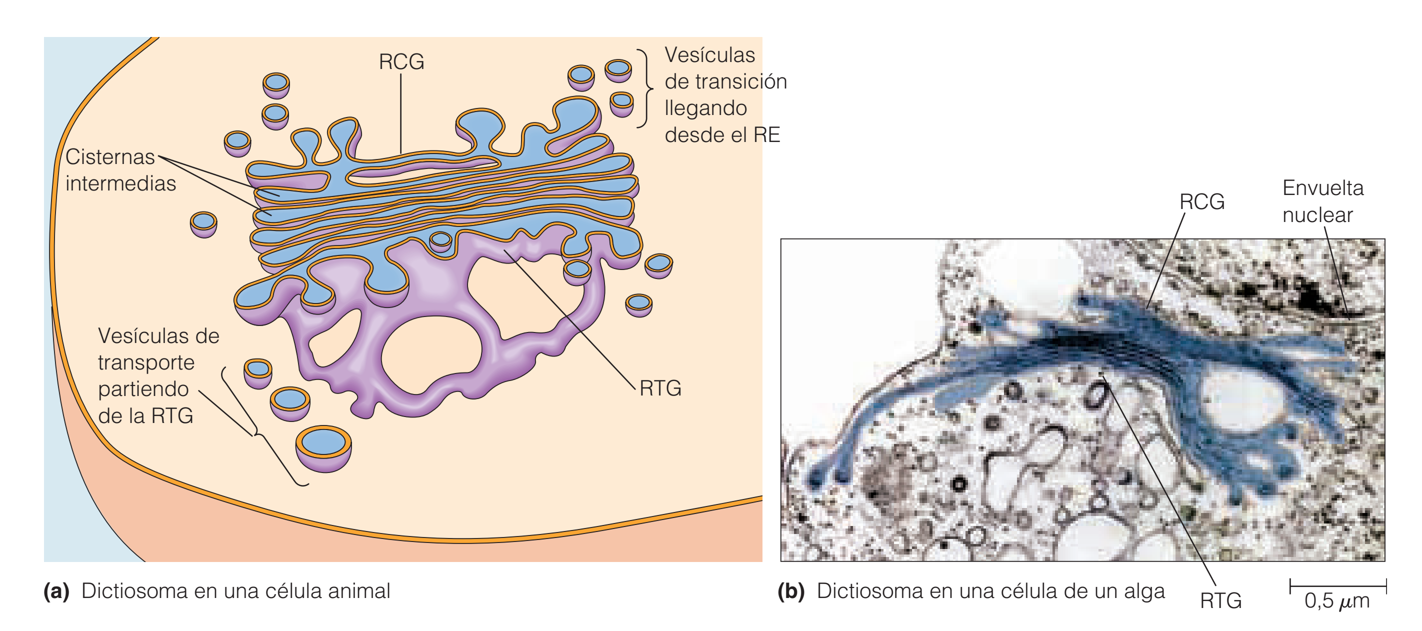


Figura 12.4 Aparato de Golgi. Cada unidad (dictiosoma) del aparato o complejo de Golgi, está formado por un número reducido de cisternas aplanadas. (**a**) En la cara *cis*, las vesículas de transición provenientes del RE se fusionan con las membranas de la red *cis*-Golgi (RCG). Desde la cara *trans* parten vesículas de transporte, que se forman en la red *trans*-Golgi (RTG). Las vesículas de transporte llevan lípidos y proteínas hacia otros componentes del sistema de endomembranas, o forman vesículas de secreción. (**b**) En esta micrografía electrónica de una célula de un alga, se muestra un dictiosoma del aparato de Golgi (destacado en azul), junto a la envuelta nuclear (TEM).

Las dos caras del dictiosoma. Cada pila del Golgi tiene dos lados (o *caras*) distintas (Figura 12.4). La **cara *cis*** (o de **formación**), mira hacia los elementos de transición del RE. El compartimiento del Golgi más próximo a dichos elementos de transición, es una red tubular denominada **red *cis*-Golgi (RCG)**. Las vesículas cubiertas provenientes del RE, cargadas con lípidos y proteínas recién sintetizados, están llegando continuamente a la RCG, con cuyas membranas se fusionan. La cara opuesta del complejo de Golgi es la **cara *trans*** (o de **maduración**). Los compartimientos de este lado, análogamente a la RCG, forman una red de túbulos, conocida como **red *trans*-Golgi (RTG)**. Aquí se forman constantemente vesículas cubiertas de transporte, que llevan las proteínas procesadas, desde el complejo de Golgi hasta los gránulos de secreción, los endosomas, los lisosomas y la membrana plasmática. Las cisternas situadas entre la RCG y la RTG, son las **cisternas intermedias** del dictiosoma y en ellas tiene lugar gran parte del procesamiento de proteínas.

Las redes RCG y RTG y las cisternas intermedias, son bioquímica y funcionalmente diferentes; cada compartimiento tiene su propia dotación de enzimas, necesarias en cada paso del procesamiento de proteínas y membranas. Las técnicas de tinción inmunológicas y citoquímicas, han demostrado que en la RCG se acumulan ciertas proteínas receptoras y enzimas, diferentes de las de las cisternas intermedias o de las de la RTG. Esta *polaridad* bioquímica se ilustra en la Figura 12.5, que muestra un dictiosoma de una célula renal de conejo. La tinción específica de la *N-acetilglucosamina transfereasa I*, la enzima que añade N-acetilglucosamina a las cadenas glucídicas de las glicoproteínas, demuestra que la enzima se concentra en las cisternas intermedias del complejo de Golgi.

Las redes RCG y RTG y las cisternas intermedias, también difieren en los tipos de vesículas cubiertas que llevan asociadas. Las vesículas formadas en el RE para el transporte de proteínas y lípidos hacia la RCG, están revestidas por proteínas COPII, mientras que las vesículas que parten de la RTG o de las cisternas intermedias, están cubiertas por COPI. Por último, las vesículas de la RTG, pueden estar cubiertas por COPI o clatrina.

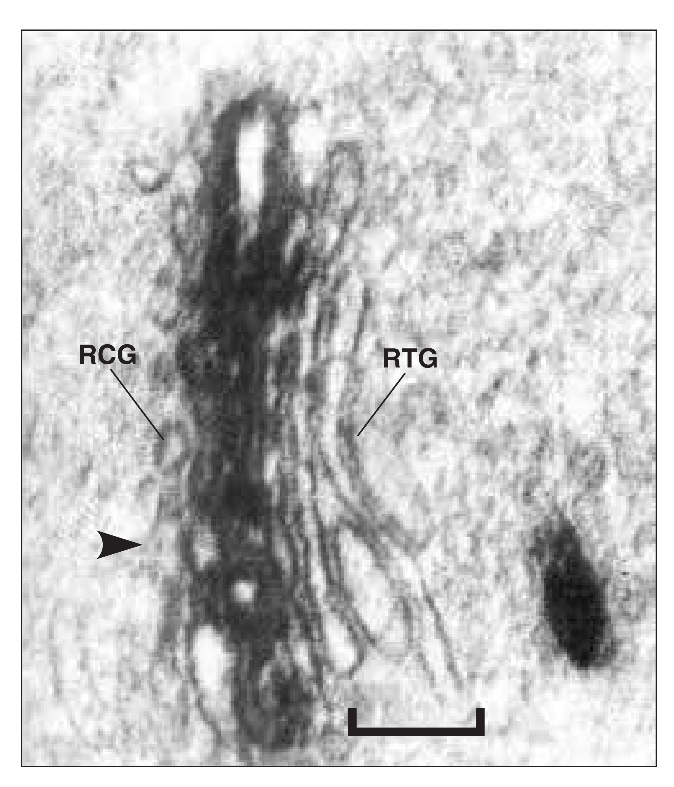


Figura 12.5 Tinción inmunocitoquímica del complejo de Golgi. En esta micrografía electrónica se puede apreciar un dictiosoma de una célula renal de conejo. La sección celular se ha teñido específicamente, para demostrar la presencia de la enzima *N-acetilglucosamina transferasa I*, que interviene en la glicosilación terminal de proteínas. La flecha y el corchete señalan a cisternas no teñidas, demostrando que la enzima se concentra en unas pocas cisternas mediales, próximas a la cara *cis* del dictiosoma. De aquí puede concluirse que la adición de N-acetilglucosamina a los oligosacáridos unidos previamente a proteínas, se produce al poco de que dichas proteínas ingresen en el aparato de Golgi (TEM).

Flujo de lípidos y proteínas a través del complejo de Golgi

Se han propuesto dos modelos para explicar el movimiento de lípidos y proteínas desde la RCG a la RTG, pasando por las cisternas intermedias del complejo de Golgi. De acuerdo con el **modelo de cisterna estacionaria**, cada compartimiento del dictiosoma es una estructura estable. El tráfico intercisternal está mediado por **vesículas de transporte**, que se forman por gemación en una cisterna y se fusionan con otra, generalmente la siguiente de la secuencia de *cis* a *trans*. Las proteínas destinadas a la RTG —que serán clasificadas y empaquetadas en vesículas con múltiples destinos— no tienen necesidad de ser seleccionadas y concentradas, sino que viajan hacia adelante, en vesículas de transporte; por el contrario, las moléculas pertenecientes al RE y sucesivos compartimientos del Golgi, deben ser retenidas o recuperadas.

De acuerdo con el segundo modelo, conocido como **modelo de maduración cisternal**, las cisternas del Golgi son compartimientos transitorios, que cambian gradualmente desde la RCG a la RTG, pasando por las cisternas intermedias. En este modelo, las vesículas del transición del RE convergen para formar la RCG, en la que se acumulan las enzimas necesarias para el procesamiento inicial de las proteínas. Paso a paso, mientras adquieren enzimas adicionales, cada cisterna *cis* se va transformando primero en cisterna intermedia y luego en cisterna *trans*. Las enzimas que van dejando de ser necesarias, regresan, vía vesículas, desde los compartimientos tardíos a los tempranos. Por último, la RTG forma vesículas o gránulos de secreción de contenido específico, que serán dirigidos a diferentes destinos más allá del complejo de Golgi.

Los dos modelos no tienen por qué ser mutuamente excluyentes: de hecho, ambos deben coexistir en cierto grado,

dependiendo del organismo y del papel de la célula. Aunque el primer modelo está apoyado por muchas evidencias, parece claro que algunos componentes de la célula presentes en el compartimiento intermedio, son demasiado grandes para ser transportados en las pequeñas vesículas de transporte. Por ejemplo, las escamas polisacarídicas de algunas especies de algas, se forman en los compartimientos tempranos del Golgi. Pese a ser excesivamente grandes para caber en las vesículas de transporte, acaban apareciendo en los compartimientos tardíos, que finalmente se fusionan con la membrana plasmática, liberando el producto final que se incorpora a la pared vegetal.

Transporte retrógrado y anterógrado. El desplazamiento de material desde el RE hacia el complejo de Golgi y la membrana plasmática, se denomina **transporte anterógrado**. Junto con los lípidos y las proteínas a transportar (el «cargo») en las vesículas están presentes las moléculas esenciales para el empaquetamiento del cargo y para dirigir a las vesículas hacia el destino apropiado. Cada vez que un gránulo de secreción se fusiona con la membrana plasmática, liberando su contenido por exocitosis, una fracción de la membrana que se originó en el RE, pasa a formar parte de la superficie celular. Para mantener el balance en el flujo de lípidos hacia la membrana plasmática, asegurando la entrada de componentes para la formación de nuevas vesículas, la célula recicla los lípidos y proteínas, que ya han cubierto sus funciones en etapas tardías del transporte anterógrado. Esta función se verifica por medio del **transporte retrógrado**, es decir, el flujo de vesículas de vuelta desde el complejo de Golgi al RE.

En el modelo de cisterna estacionaria, el flujo retrógrado facilita la recuperación de lípidos y proteínas específicos, que pasan del RE a la cara *cis* de un dictiosoma próximo, o el retorno de proteínas específicas de cada parte de las cisternas mediales. El material destinado a la RTG continúa hacia adelante. No está claro si este flujo retrógrado se produce desde cada cisterna intermedia hacia el RE, o si tiene lugar de forma discreta, retrocediendo sucesivamente, de cisterna en cisterna. En el modelo de maduración cisternal, el flujo retrógrado recupera el material gracias a compartimientos recién formados, en los que se incluyen los receptores y enzimas, que ya no son necesarios en los compartimientos más maduros.

Papel del RE y el complejo de Golgi en la glicosilación de proteínas

Buena parte del procesamiento de proteínas que tiene lugar en el complejo de Golgi, está relacionado con la **glicosilación**, es decir, la adición de cadenas laterales de hidratos de carbono, a residuos aminoacílicos específicos de proteínas, para formar las **glicoproteínas**. Posteriormente se modifica el oligosacárido añadido, en una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente. Existen dos tipos de glicosilaciones (*véase* la Figura 7.25). La **glicosilación asociada a N** (o **glicosilación en N**) supone la adición de una unidad específica de oligosacárido al grupo amino terminal de ciertos residuos de asparagina, que aparecen como parte de la secuencia de tres residuos Asn-X-Ser o Thr, siendo X cualquier aminoácido, excepto prolina (*véase* la Tabla 3.3, para las abreviaturas de los aminoácidos). La **glicosilación en O** consiste en la adición del oligosacárido al grupo hidroxilo de determinados residuos de serinas o treoninas. Cada etapa de la glicosilación es estrictamente dependiente del paso precedente. Un error en una etapa, debido quizá a una enzima anómala, puede bloquear futuras modificaciones del carbohidrato y terminar con consecuencias graves para el metabolismo celular, que a menudo provocan la enfermedad del organismo.

Nos centraremos ahora en la glicosilación en N. Conceptualmente, el proceso puede dividirse en dos etapas —la glicosilación inicial y las modificaciones posteriores en la cadena lateral—. Como se ilustra en la Figura 12.6, las enzimas que catalizan varios pasos de la glicosilación y modificaciones subsecuentes, se encuentran en diferentes compartimientos, o grupos de compartimientos, del RE y el complejo de Golgi.

La primera etapa de la glicosilación en N, denominada **glicosilación central**, se verifica en el RE. El azúcar que se une directamente a la asparagina, es siempre *N-acetilglucosamina* (*GlcNAc*), hidrato de carbono modificado, que ya vimos en el Capítulo 3 (*véase* Figura 3.26a). Pese a la variedad de oligosacáridos encontrados en las glicoproteínas maduras, todos los hidratos de carbono añadidos a las proteínas en el RE, tienen un esqueleto común rico en manosa, formado por dos unidades de GlcNAc, nueve de manosa y tres de glucosa. Este **oligosacárido central**, se ensambla por la adición secuencial de los monosacáridos a un transportador activado, de naturaleza lipídica, denominado *dolicol fosfato*. El ensamblaje del oligosacárido central se muestra en la Figura 12.7. Obsérvese que las etapas tempranas del proceso tienen lugar en la cara citosólica de la membrana del RE y las tardías en la luz del propio RE. La traslocación desde el citosol hacia la luz del RE, está catalizada por una flipasa específica. Una vez completado el núcleo, se transfiere por completo desde el dolicol al residuo de asparagina de la proteína, reacción catalizada por la enzima de membrana, *oligosacaril transferasa*. Normalmente la adición del oligosacárido central se produce conforme se sintetiza el polipéptido, en un ribosoma asociado a la membrana del RE. Esta glicosilación cotraslacional colabora en el correcto plegamiento de la proteína. La inhibición de la glicosilación resulta en la aparición de agregados de proteínas mal plegadas.

Durante la segunda etapa de la glicosilación en N, el oligosacárido central se recorta y modifica. Como en la glicosilación central, las etapas iniciales se producen en el RE y a menudo ocurren antes de que se haya completado la bio-

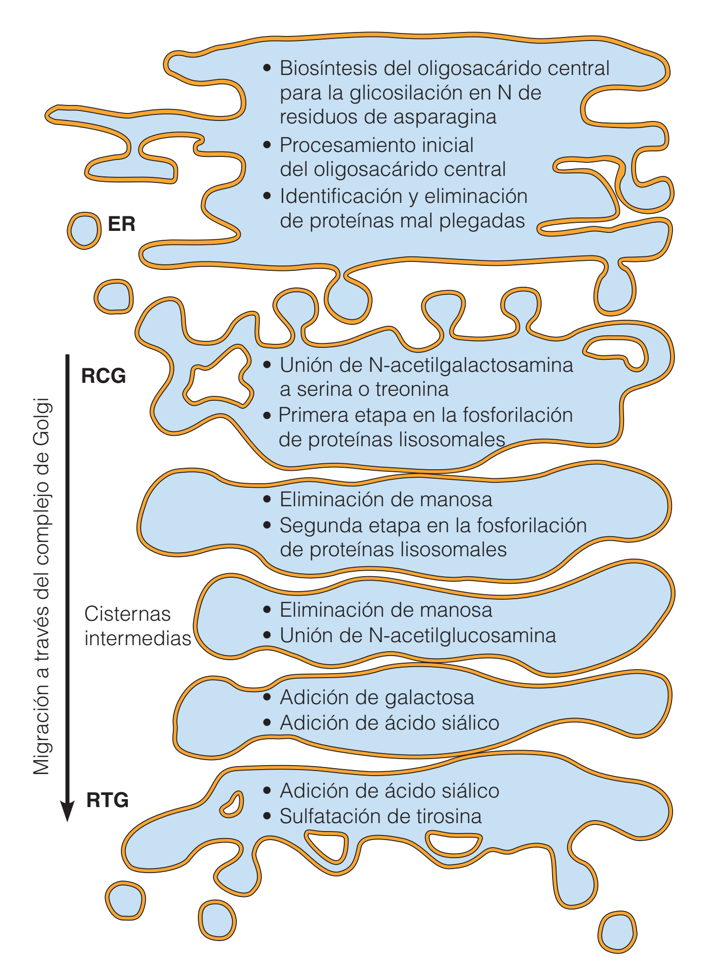


Figura 12.6 Compartimentación de las etapas de la glicosilación y subsecuentes modificaciones de proteínas. Las enzimas que catalizan la glicosilación y modificaciones posteriores de las proteínas, residen en diferentes compartimientos, o grupos de compartimientos, del RE y el complejo de Golgi. El procesamiento tiene lugar secuencialmente, conforme las proteínas emigran de un compartimiento a otro. Las etapas enumeradas en la figura, son ejemplos de modificaciones posibles, que no tienen porqué ocurrir en todas las glicoproteínas.

síntesis de la cadena polipeptídica. Por la acción de glucosidasas y manosidasas, se eliminan tres unidades de glucosa y una de manosa. Durante este proceso, interaccionan varias proteínas del RE con la glicoproteína recién sintetizada, para asegurar su correcto plegamiento. La **calnexina** (CNX, proteína de membrana) o la **calreticulina** (CRT, soluble) pueden unirse a la glicoproteína monoglucosilada y promover la formación de puentes disulfuro, gracias a que forman un complejo con la glicoproteína y una tiol oxidorreductasa conocida como *Erp57*. Una vez formado el puente disulfuro, el complejo protéico se disocia y la unidad final de glucosa se elimina por la enzima *glucosidasa II*.

En este punto, una glucosil transferasa del retículo, la *UGGT* (*UDP-glucosa:glicoproteína glucotransferasa*) actúa como un sensor del correcto plegamiento de la glicoproteína recién sintetizada. La UGGT se une a las proteínas mal plegadas, añadiendo una unidad de glucosa, consiguiendo que la glicoproteína entre en un nuevo ciclo de unión a CNX/CRT, para formar puestes disulfuro. Una vez que la proteína se ha plegado correctamente, no vuelve a ser reconocida por la UGGT y es libre para salir del RE y alcanzar el complejo de Golgi. Cuando llegue aquí, la glicoproteína sufrirá nuevas modificaciones, a medida que vaya pasando, desde la cara *cis*, hacia las cisternas intermedias y la cara *trans*. Estas **glicosilaciones terminales** muestran una variabilidad destacable, que responde a la gran diversidad en estructura y función de las cadenas laterales de oligosacáridos de las glicoproteínas.

La glicosilación terminal incluye siempre la eliminación de unas cuantas de las unidades que se añadieron como parte del oligosacárido central. En algunos casos no hay ningún procesamiento cuando la glicoproteína alcanza el complejo de Golgi. Los *oligosacáridos ricos en manosa* resultantes, retienen las dos unidades de GlcNAc y de seis a ocho de las manosas. En otros casos se generan *oligosacáridos complejos*, por adición ulterior de N-acetil-glucosamina y otros carbohidratos, como la galactosa, el ácido siálico o la fucosa (las estructuras de la galactosa y del ácido siálico se muestran en la Figura 7.26a). En función del carbohidrato, la adición tendrá lugar en un compartimiento medial, próximo a la cara trans del complejo de Golgi, o en la RTG. Cuando las glicoproteínas salen del complejo de Golgi, pueden llevar exclusivamente oligosacáridos ricos en manosa, oligosacáridos complejos, o ambos.

Visto el papel del complejo de Golgi en la glicosilación, no sorprende que dos de las más importantes categorías de enzimas presentes en los dictiosomas, sean las *glucán sintetasas* y las *glucosil transferasas*. Las glucán sintetasas catalizan la formación de oligosacáridos a partir de monosacáridos, y las glucosil transferasas unen carbohidratos a las proteínas. Como indicador de la posible complejidad de las cadenas laterales de oligosacáridos, baste citar que hay cientos de glicosil transferasas diferentes en el RE y el complejo de Golgi. Éstas y otras enzimas se distribuyen en el dictiosoma de forma consistente con su papel en el proceso de glicosilación, de manera que cada cisterna contiene una colección específica de enzimas.

Conviene destacar que la glicosilación ocurre exclusivamente en la cara luminal y no en la citosólica de las membranas del RE y complejo de Golgi. Las glicoproteínas y glicolípidos ensamblados en estos orgánulos son, por tanto, elementos que contribuyen a la asimetría de la membrana. Siguiendo a su biosíntesis, las proteínas y lípidos glicosilados miran a la luz del RE y complejo de Golgi. Cuando las vesículas de transporte parten de estos orgánulos para fusionarse con otras membranas, también se exporta la asimetría establecida durante la glicosilación. Dado que la cara luminal del RE es topológicamente equivalente a la superficie externa de la célula, se comprende por qué todos los oligosacáridos de las glicoproteínas, se encuentran en la cara extracelular de la membrana plasmática.

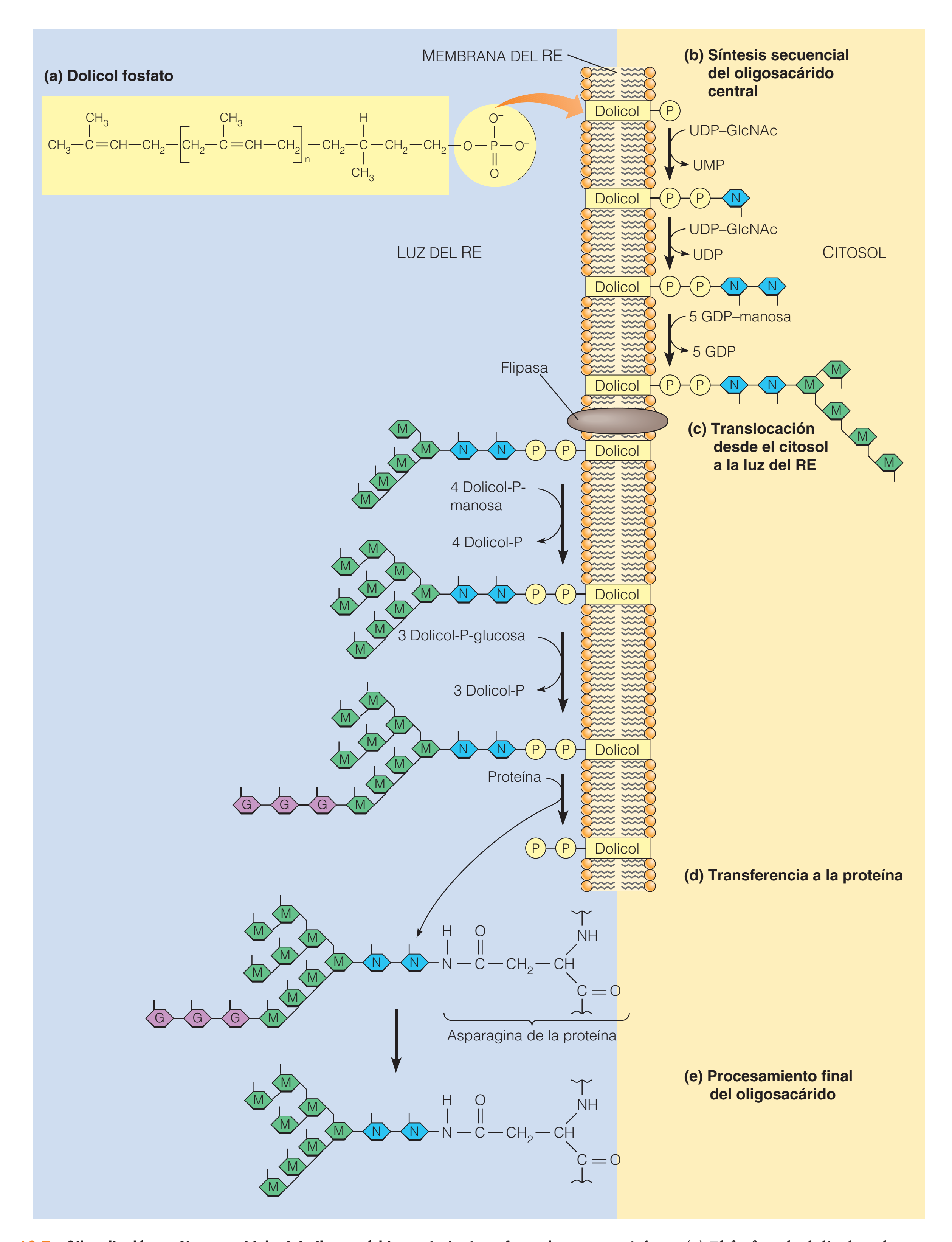


Figura 12.7 **Glicosilación en N: ensamblaje del oligosacárido central y transferencia a una proteína.** (**a**) El fosfato de dolicol es el transportador de unidades del oligosacárido, que se transfieren a residuos de asparagina de determinadas proteínas. En mamíferos, ***n*** suele ser 18. (**b**) Síntesis secuencial del oligosacárido central, rico en manosa, por adición sucesiva de unidades de N-acetilglucosamina (N), manosa (M) y glucosa (G), a la cadena en crecimiento. (**c**) Un translocador de fosfolípidos (flipasa) expone al oligosacárido, aún incompleto, hacia el interior del RE. (**d**) El oligosacárido central, ya maduro, se transfiere desde el dolicol a un residuo de asparagina de la proteína. (**e**) Eliminación en el RE de ciertas unidades de glucosa y manosa, antes de que la glicoproteína sea transferida al Golgi.

Funciones del RE y el complejo de Golgi en el tráfico de proteínas

Las proteínas solubles y de membrana sintetizadas en ribosomas asociados al RE rugoso, deben dirigirse a diferentes localizaciones intracelulares, que incluyen al propio RE, al complejo de Golgi, a los endosomas y a los lisosomas. Es más, una vez que una proteína llega al orgánulo en el que se supone debe permanecer, tiene que apoyarse en algún mecanismo que impida su salida. Otro grupo de proteínas sintetizadas en el RE rugoso, están destinadas a su incorporación en la membrana plasmática o a su liberación hacia el medio extracelular. Cada proteína tiene una «etiqueta» específica que permite su inclusión en la vesícula de transporte apropiada. En función de la proteína y su destino, la marca puede ser una secuencia específica de aminoácidos, una cadena lateral oligosacarídica, un dominio hidrófobo u otra particularidad. Las etiquetas se pueden utilizar también como elementos a excluir de ciertas vesículas.

Recientemente se ha demostrado que los lípidos de membrana también se pueden etiquetar, facilitando que las vesículas alcancen los destinos apropiados. La marca puede ser uno o más fosfatos añadidos a las posiciones 3, 4 ó 5 de una molécula de fosfatidil inositol (PI) de la membrana. Así, por ejemplo, se ha visto que para se distribuyan correctamente las vesículas hacia la vacuola de una levadura, es preciso que esté presente una PI-3-quinasa funcional. La inhibición de las quinasas de inosítidos en mamíferos, perturban el tráfico de vesículas hacia el lisosoma. Además de las etiquetas, la longitud y el grado de saturación de ciertos lípidos de membrana, parecen ser importantes en el tráfico de vesículas.

El tráfico asociado al RE y el complejo de Golgi se esquematiza en la Figura 12.8. La clasificación de proteínas comienza en el retículo y compartimientos tempranos del

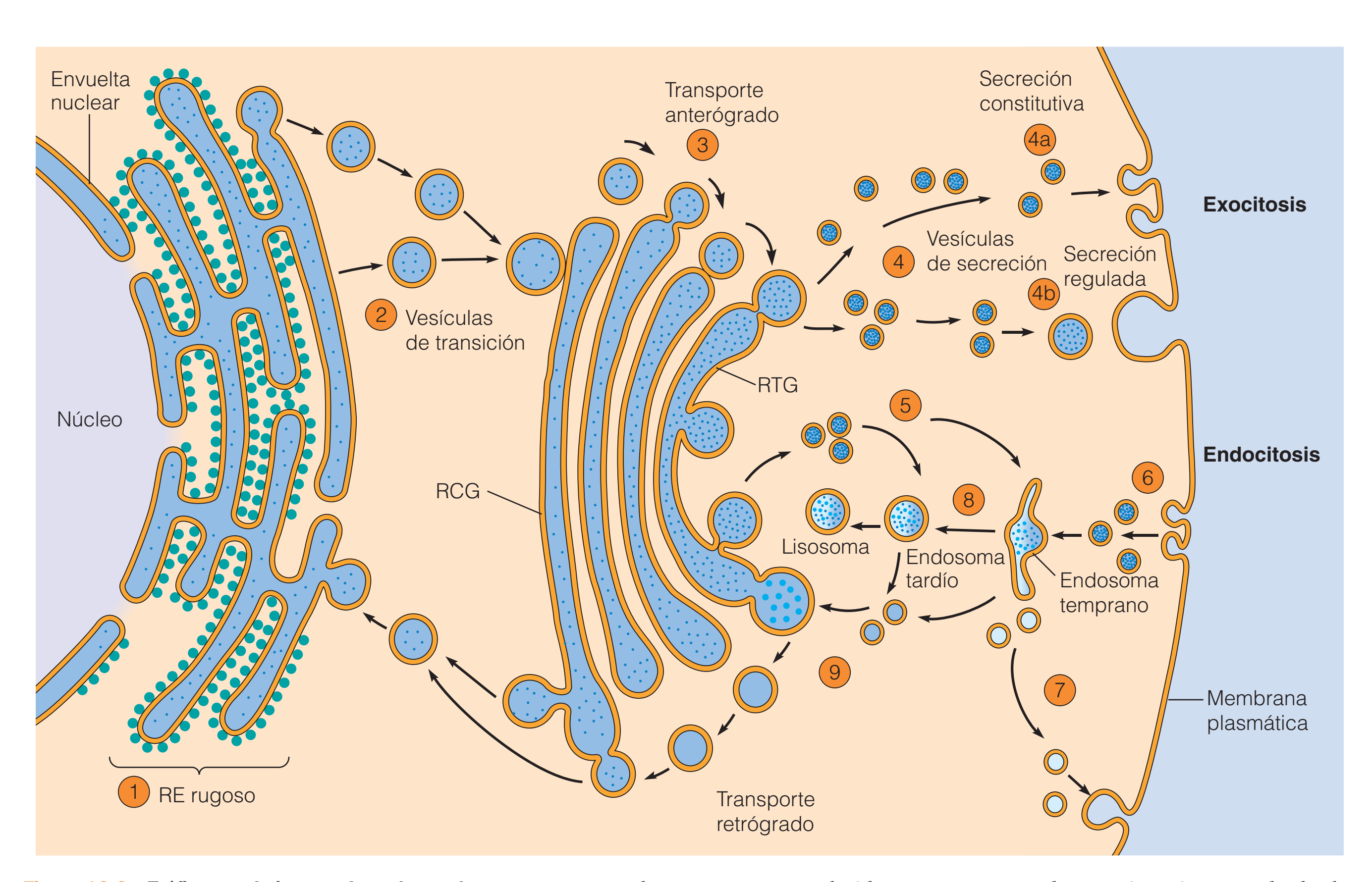


Figura 12.8 Tráfico en el sistema de endomembranas. Las vesículas que transportan lípidos y proteínas pueden seguir varias rutas desde el RE y el complejo de Golgi, dando lugar a vesículas de secreción, endosomas y lisosomas. ① Las proteínas se sintetizan en los ribosomas unidos a la cara citosólica del RE rugoso. ② Las etapas iniciales de la glicosilación tienen lugar en la luz del RE. Las vesículas de transición llevan hacia la RCG a los lípidos y glicoproteínas recién sintetizados. ③ Los lípidos y proteínas se desplazan por el dictiosoma gracias a vesículas o a cisternas que van madurando. Desde la RTG parten las que serán las vesículas de secreción ④ y las que formarán parte de los endosomas ⑤, en función de su contenido proteico. Las vesículas de secreción se dirigen hacia la membrana plasmática, donde liberan, su contenido por exocitosis, bien ④a constitutiva, bien ④b como respuesta a una señal. ⑥ La célula toma por endocitosis proteínas y otros materiales, fabricando así vesículas de endocitosis, que se fusionan con los endosomas tempranos. ⑦ Los componentes no destinados a la digestión que sigue a la endocitosis, son reciclados hacia la membrana plasmática. ⑧ Los endosomas tempranos, con el material destinado a la digestión, maduran dando lugar, primero a los endosomas tardíos, y luego a los lisosomas. ⑨ El tráfico retrógrado permite el retorno de proteínas específicas a sus compartimentos correspondientes.

dictiosoma, en los cuales existen mecanismos para recuperar o retener sus proteínas específicas. Éste es un paso importante en el proceso de clasificación, pues preserva la función inherente al compartimiento, que permite que se puedan llevar a cabo la glicosilación y otros procesamientos. La clasificación final del material que debe abandonar el complejo de Golgi, tiene lugar en la RTG, donde lípidos y proteínas se empaquetan selectivamente en diferentes poblaciones de vesículas de transporte, cada una destinada a un lugar diferente de la célula. En algunas células, el complejo de Golgi está también involucrado en el procesamiento de proteínas que entran en la célula por endocitosis.

Las proteínas específicas del RE llevan etiquetas de recuperación

La composición del RE se mantiene a base de prevenir la fuga de proteínas durante los fenómenos de vesiculación, y de recuperar a las proteínas que han alcanzado la RCG. No está claro cómo se retienen las proteínas, ni cuáles son las señales que permiten tal retención. De acuerdo con una teoría, las proteínas que permanecen en el RE rugoso forman complejos muy extensos, que quedan físicamente excluidos de las vesículas de transición.

La recuperación —que se produce por flujo retrógrado de vesículas de transporte desde la RCG al RE (Figura 12.8, ⑨)— es mucho mejor conocida. Muchas de las proteínas solubles residentes del RE, llevan etiquetas que se unen a receptores de membrana específicos, orientados hacia la luz del complejo de Golgi. Estas etiquetas son secuencias cortas de aminoácidos, como KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu), en mamíferos y HDEL (His-Asp-Glu-Leu), en levaduras (secuencias basadas en las abreviaturas de aminoácidos de una sola letra; *véase* la lista en la Tabla 3.3). Cuando una proteína que lleve esta señal se una al receptor, éste sufrirá un cambio conformacional y el complejo receptor-ligando se empaquetará en vesículas de transporte, que retornarán al RE.

La importancia de las etiquetas de recuperación se evidencia en experimentos con proteínas quiméricas. Una proteína quimérica está formada por fragmentos polipeptídicos derivados de dos proteínas diferentes, que se unen para formar un polipéptido único. En este tipo de experimentos, se altera una proteína de secreción para que incluya una secuencia que contiene una etiqueta de retención en el RE. En muchos casos, estas proteínas vuelven al RE tras sufrir un procesamiento parcial en el complejo de Golgi. El procesamiento de las proteínas quiméricas por enzimas que sólo se encuentran en el aparato de Golgi, indica que la etiqueta no se limita a impedir el escape de las proteínas, sino que se produce una auténtica recuperación desde el dictiosoma. Lo que no está claro aún, es si el transporte retrógrado se produce desde una cisterna cualquiera del dictiosoma directamente al RE, o si se ocurre pasando de una cisterna a la precedente y así, de una en una, hasta alcanzar el RE.

Las proteínas del complejo de Golgi se pueden clasificar por la longitud de sus dominios transmembrana

Al igual que ocurre con las proteínas del ER, es probable que algunas de las proteínas residentes en el aparato de Golgi, posean secuencias de aminoácidos, que sirvan como etiquetas para la retención o la recuperación. Además, y como ya se sugirió para las proteínas específicas del RE, en el aparato de Golgi se pueden formar grandes complejos, que quedan físicamente excluidos de las vesículas de transporte. Por último, hay un tercer mecanismo de clasificación, específico de este orgánulo.

Todas las proteínas residentes conocidas del complejo de Golgi están en la membrana. Por tanto, cada una de ellas tiene uno o más dominios hidrófobos, que la atraviesan, facilitando su anclaje. La longitud de una proteína en particular, puede determinar en qué cisterna queda confinada, conforme avanza por el dictiosoma. Recordemos que el grosor de la membrana aumenta progresivamente desde el RE (unos 5 nm) a la membrana plasmática (unos 8 nm). En el complejo de Golgi se comprueba que hay un incremento en la longitud de los segmentos transmembrana de las proteínas, desde la RCG a la RTG. Las proteínas tienden a desplazarse de compartimiento en compartimiento, hasta que el grosor de la membrana excede la longitud de los segmentos transmembrana, deteniéndose la emigración.

La distribución de proteínas lisosomales hacia los endosomas y lisosomas, es un ejemplo de la clasificación de proteínas en la RTG

Durante su viaje a través del RE y los compartimientos tempranos del aparato de Golgi, las enzimas lisosomales solubles y otras glicoproteínas, sufren la glicosilación en N, seguida de eliminación de unidades de glucosa y manosa. Posteriormente, dentro del complejo de Golgi, se fosforilan los residuos de manosa de las cadenas glucídicas laterales de las enzimas lisosomales, dando lugar a oligosacáridos que poseen manosas-6-fosfato. Esta etiqueta oligosacárida distingue a las proteínas lisosomales solubles de otras glicoproteínas y asegura su llegada a los lisosomas (Figura 12.9).

La fosforilación de los residuos de manosa está catalizada por dos enzimas específicas del Golgi. La primera, localizada en un compartimiento temprano del dictiosoma, es una fosfotransfererasa que añade GlcNAc-1-fosfato al átomo de carbono 6 de la manosa. La segunda, propia de un compartimiento intermedio del Golgi, elimina GlcNAc, destapando el residuo manosa-6-fosfato.

En correspondencia, la superficie interna de la membrana de la RTG, presenta receptores manosa-6-fosfato (RMF). El pH en la RTG está en torno a 6,4, lo que favorece la unión de las enzimas solubles lisosomales a los receptores. Una vez unidas a los RMF, los complejos receptor-ligando se empaquetan en vesículas de transporte cubiertas por clatrina y se distribuyen hacia los endosomas. En las cé-

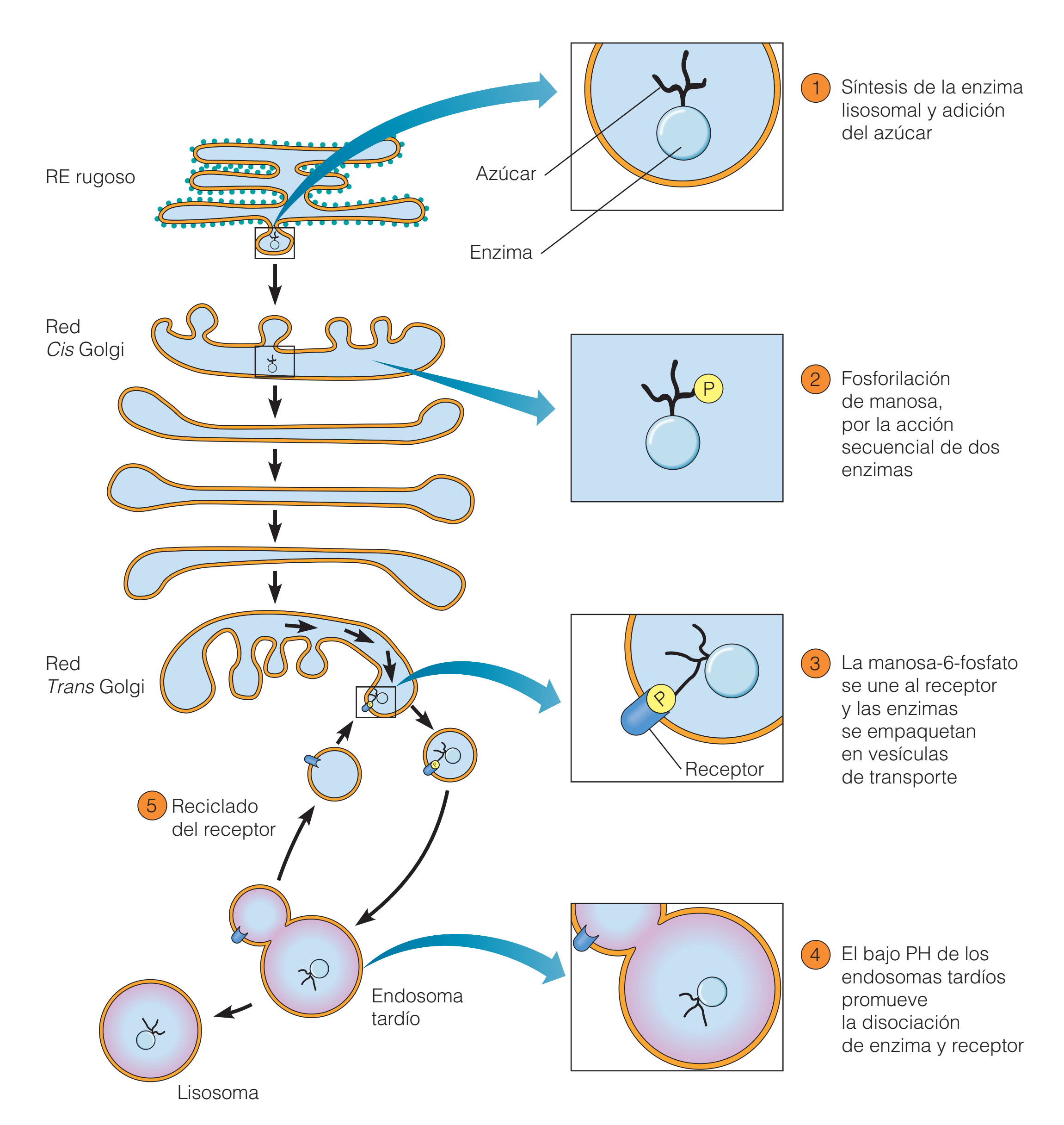


Figura 12.9 Distribución de enzimas lisosomales solubles hacia los endosomas y lisosomas, mediada por la etiqueta manosa-6-fosfato. ① En el RE, las enzimas lisosomales sufren una glicosilación en N, seguida de eliminación de unidades de glucosa y manosa. ② Una vez en el complejo de Golgi, los residuos de manosa de las enzimas lisosomales, se fosforilan en dos reacciones enzimáticas. En la primera se añade N-acetilglucosanina-1-fosfato al carbono 6 de la manosa y en la segunda se elimina N-acetilglucosamina, exponiendo el residuo de manosa fosforilada. ③ Las enzimas lisosomales, ahora etiquetadas, se unen a los receptores manosa-6-fosfato de la RTG y se empaquetan en vesículas cubiertas de transporte, que alcanzan a los endosomas tardíos. ④ La acidez de la luz de los endosomas tardíos, hace que se disocien las encimas de sus receptores. ⑤ Los receptores se reciclan en vesículas que vuelven a la RTG. Los endosomas tardíos maduran, formando lisosomas, o transfieren su contenido a un lisosoma activo.

lulas animales, las enzimas lisosomales necesarias para la degradación del material tomado por endocitosis, se transportan desde la RTG, hasta unos orgánulos conocidos como **endosomas tardíos**. Éstos constituyen la evolución de los **endosomas tempranos**, formados por la reunión de vesículas originadas en la RTG y en la membrana plasmática. Conforme maduran hacia endosomas tardíos, el pH en la luz baja hasta aproximadamente 5,5. Esta acidez hace que las enzimas lisosomales se disocien de sus RMF y previene el movimiento retrógrado de dichas enzimas hacia el complejo Golgi durante el reciclado de los receptores, que vuelven en vesículas a la RTG. Por último, el endosoma tardío madura para formar un nuevo lisosoma o libera su contenido en un lisosoma activo. Las *proteínas de membrana asociadas a los lisosomas* siguen una ruta más larga, viajando hacia la membrana plasmática y reentrando en la célula por endocitosis y transporte hacia un endosoma temprano.

En el conocimiento de esta forma de distribución de las enzimas lisosomales, han sido esenciales los estudios de una alteración hereditaria humana, conocida como *mucolipi-*

dosis de tipo II. Los fibroblastos de los pacientes son capaces de sintetizar, en cultivo, todas las enzimas lisosomales, pero en lugar de incorporarlas en los lisosomas, vierten la mayoría de ellas hacia el medio extracelular. La ausencia de residuos manosa-6-fosfato en las cadenas laterales oligosacáridas, es una característica común a todas las proteínas mal dirigidas. Es evidente de la etiqueta glucídica modificada es la responsable del desvío de las glicoproteínas solubles hacia la ruta de secreción. Hoy día se sabe que la mucolipidosis de tipo II está originada por una deficiencia en la fosfotransferasa, la primera de las enzimas implicadas en la adición de manosa-6-fosfato a las enzimas lisosomales. De todas formas, además de los residuos manosa-6-fosfato, debe haber otros mecanismos implicados en la distribución de las enzimas, pues en los enfermos de mucolipidosis de tipo II, sí se detectan hidrolasas ácidas lisosomales en las células hepáticas.

Las rutas de secreción transportan moléculas hacia el exterior de la célula

Las **rutas de secreción** forman parte del tráfico de vesículas esquematizado en la Figura 12.8. Estas rutas se basan en el desplazamiento de proteínas desde el RE y a través del complejo de Golgi, hasta las **vesículas de secreción** y **gránulos de secreción**, que luego descargan su contenido al exterior (④). El papel coordinado del RE y el aparato de Golgi en la secreción, fue demostrado por primera vez por George Palade y sus colaboradores, que emplearon métodos autorradiográficos para trazar el destino de proteínas marcadas radiactivamente, en células de las glándulas salivales.

Los resultados de uno de los experimentos de Palade se resumen en la Figura 12.10. A los pocos minutos de inyectar en conejos un aminoácido radiactivo, las proteínas recién sintetizadas, identificables por contener el aminoácido radiactivo, se encuentran sólo en el RE del tejido secretor. Poco después, la radiactividad se empieza a detectar en el complejo de Golgi, alcanzando el máximo a los 30-40 minutos. A los 30 minutos, las proteínas marcadas se encuentran también en vesículas que parten de la RTG, a las que Palade llamó *vacuolas de condensación*. A los 90 minutos, la radiactividad se acumula en los gránulos de secreción, que son vesículas que vacían su contenido hacia el exterior. Aunque no se muestra en la figura, las proteínas marcadas terminan por aparecer en el medio extracelular, demostrando que los gránulos de secreción, realmente vierten su contenido más allá de la membrana plasmática.

Gracias a los experimentos de Palade y colaboradores y a otros similares realizados posteriormente, la rutas de secreción de la Figura 12.8, son hoy día bastante bien conocidas. En las células eucariotas existen dos formas de secreción. La *secreción constitutiva* es la descarga continua de vesículas en la membrana plasmática, mientras que la *regulada* se caracteriza por la descarga rápida y controlada, generalmente en respuesta a una señal extracelular.

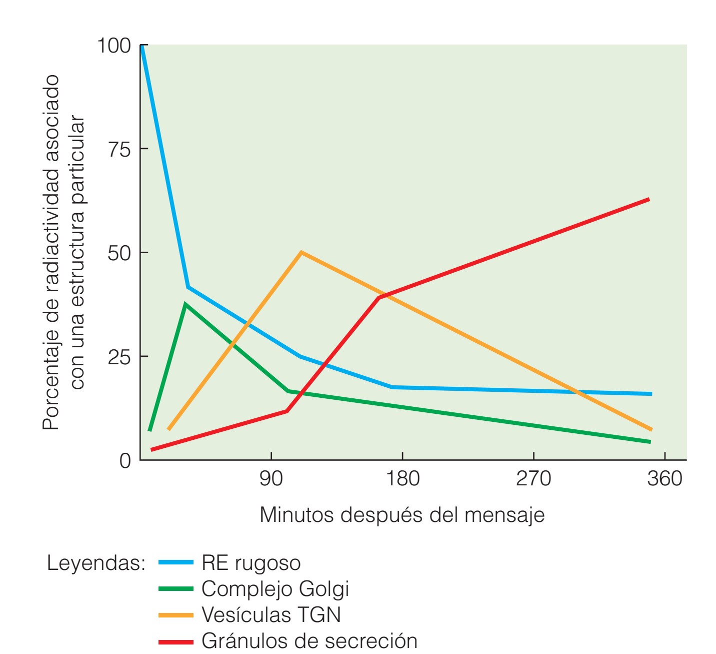


Figura 12.10 Autorradiografía de la ruta de secreción. Para seguir el destino de las proteínas recién sintetizadas en una célula, George Palade y sus colaboradores inyectaron conejos con un aminoácido radiactivo e hicieron autorradiogramas de las glándulas salivales, a diferentes tiempos post-inyección, para comprobar la distribución de las proteínas radiactivas. En el Apéndice se describe la autorradiografía aplicada a la microscopía.

Secreción constitutiva. Después de su formación en la RTG, algunas de las vesículas de secreción se dirigen directamente a la superficie celular, donde se fusionan de inmediato con la membrana plasmática y liberan su contenido. Este proceso, que es continuo e independiente de señales extracelulares específicas, se conoce como **secreción constitutiva**. Como ejemplo, citemos a la secreción de mucus por parte de las células que tapizan el intestino o la secreción de glicoproteínas hacia la matriz extracelular.

Durante muchos años, se ha supuesto que la secreción constitutiva era la *ruta por defecto* para las proteínas sintetizadas en ribosomas asociados al RE. De acuerdo con este modelo, todas las proteínas destinadas al transporte desde el RE al complejo de Golgi, debían tener etiquetas que les permitieran salir de la secreción constitutiva. A menos que una secuencia aminoacílica o un oligosacárido lateral señalaran a una proteína para su retención, ésta se desplazaría por el sistema de endomembranas, hasta ser liberada al exterior. Este modelo estaba apoyado en estudios en los que se eliminaban las etiquetas de recuperación de proteínas específicas del RE y se exploraba su nuevo destino. La eliminación de las secuencias KDEL de proteínas residentes en el RE, generalmente resultan en su secreción. Sin embargo, hay evidencias recientes que permiten suponer la existencia de varias secuencias cortas de aminoácidos, que marcan a las proteínas para seguir una de las diferentes rutas de secreción constitutiva.

Secreción regulada. Mientras que las vesículas que contienen las proteínas de secreción constitutiva, están siendo constantemente enviadas desde la RTG a la membrana plasmática, las vesículas implicadas en la **secreción regulada**, se acumulan en la célula y sólo se fusionan con la membrana plasmática cuando reciben una orden extracelular específica. Un ejemplo bien conocido es la liberación de neurotransmisores que será descrita en el Capítulo 13 (Figura 13.19). Otros dos ejemplos más son la liberación de insulina por las células β de los islotes de Langerhans del páncreas y la secreción de enzimas digestivas por las células acinares del páncreas.

Las vesículas de secreción regulada salen de la RTG como vesículas inmaduras, que pierden la cubierta de clatrina e inician un proceso de maduración. Ésta implica la concentración de las proteínas —conocida como *condensación*— y, a menudo, el procesamiento proteolítico de la proteína. La vesícula madura se dirige hacia la región por la que será secretada, donde permanecerá hasta recibir la señal de liberación por exocitosis.

Las vesículas de secreción regulada maduras suelen ser mucho mayores y llevan una mayor concentración de proteína que las de secreción constitutiva. Estas grandes vesículas se denominan generalmente *gránulos de secreción* o de *zimógeno*, para distinguirlas de otras vesículas. Como se muestra en la Figura 12.11, los gránulos de zimógeno (ZG) se concentran en la región situada entre los dictiosomas, de los cuales proceden, y la porción de membrana plasmática que limita la luz en la que descargarán los gránulos.

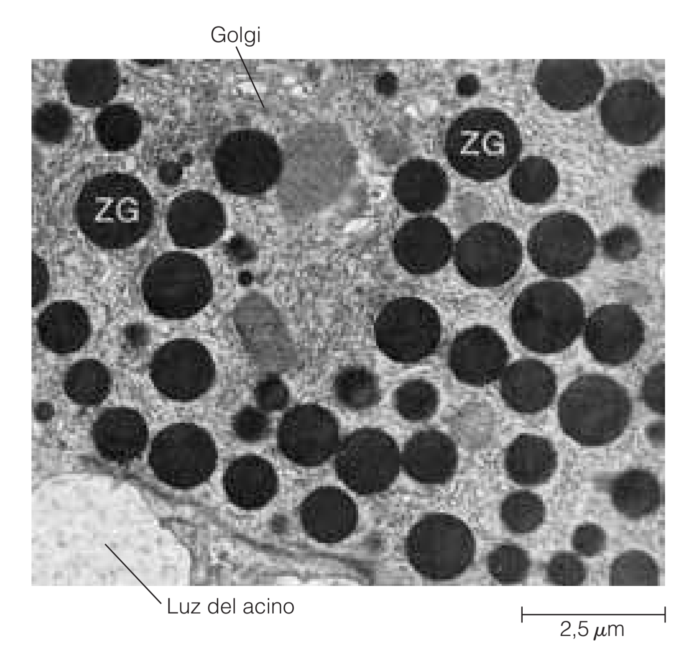


Figura 12.11 Gránulos de zimógeno. Micrografía electrónica de los gránulos de zimógeno (ZG) de una célula acinar (secretora) del páncreas exocrino de una rata. Los gránulos de zimógeno suelen concentrarse entre la zona del complejo de Golgi, a partir de la cual se forman y la membrana plasmática que bordea la luz del acino, a la cual vierten precisamente su contenido, por exocitosis (TEM).

La información necesaria para dirigir a una proteína hacia una vesícula, es posiblemente inherente a su propia secuencia aminoacílica, si bien la naturaleza de la señal y los mecanismos de clasificación, no están claros. Hay evidencias de que las proteínas de secreción forman grandes *agregados*, que excluyen a proteínas no secretoras. Este fenómeno podría tener lugar, bien en la RTG, en la que sólo los agregados se empaquetarían en vesículas destinadas a ser gránulos de secreción, o bien en los propios gránulos de secreción. El pH de la RTG y de los gránulos de secreción, puede servir como desencadenante de la agregación. Las proteínas solubles que no puedan integrarse en el agregado en la RTG o el gránulo de secreción, podrían ser empaquetadas en vesículas de transporte y dirigidas hacia otros destinos.

Exocitosis y endocitosis: transporte de material a través de la membrana plasmática

Los dos métodos de intercambio de material a través de la membrana plasmática son la *exocitosis*, por la cual los gránulos de secreción segregan su contenido hacia el exterior y la *endocitosis*, por la que las células introducen los materiales del exterior. Ambos procesos son exclusivos de células eucariotas. Consideraremos primero la exocitosis por ser el paso final de una ruta de secreción que comienza en el RE y el complejo de Golgi.

La exocitosis libera moléculas de la célula en el medio extracelular

En la exocitosis, las proteínas retenidas en el interior de la vesícula, se descargan al exterior, cuando la vesícula se fusiona a la membrana plasmática. Por este método se exportan multitud de proteínas, tanto en las células animales, como en las vegetales. Las células animales segregan péptidos y proteínas hormonales, mucus, proteínas lácteas y enzimas digestivas. Las células de vegetales y las bacterias, segregan proteínas asociadas con la pared celular, incluyendo a proteínas estructurales y enzimáticas.

Las etapas de la exocitosis se ilustran esquemáticamente en la Figura 12.12. Las vesículas que contienen los productos celulares destinados a la secreción, se dirigen a la superficie celular (①), donde se funden las membranas vesical y plasmática (②). La membrana plasmática se expande, facilitando la secreción (③). Durante el proceso, la membrana de la vesícula se integra en la membrana plasmática, de forma que la superficie *interna* (luninal) de la vesícula, se convierte en la superficie externa de la membrana plasmática (④). Las glicoproteínas y glicolípidos que permanecen anclados a la membrana, se exponen hacia el espacio extracelular.

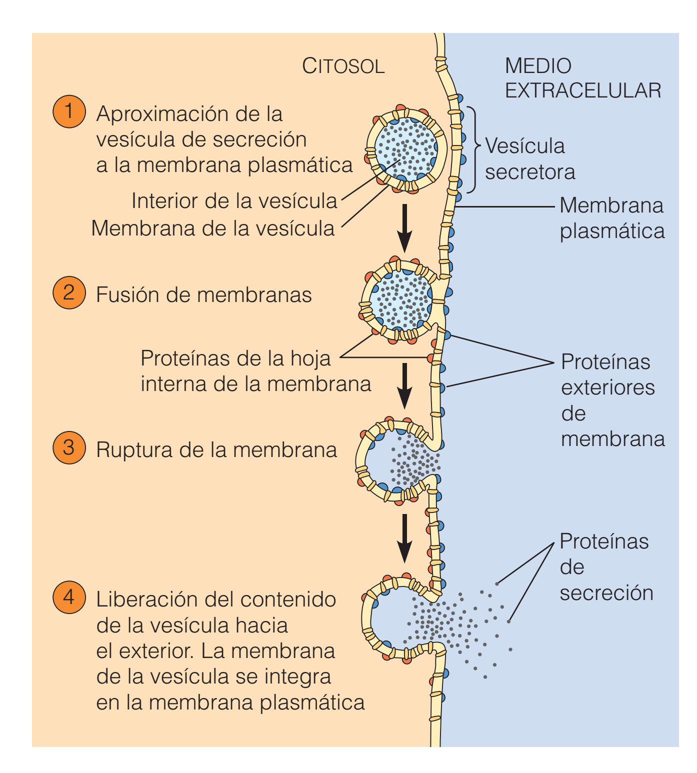


Figura 12.12 **Exocitosis.** Liberación al exterior del contenido de un gránulo o vesícula de secreción. Para mayor claridad, se han omitido las proteínas que facilitan el anclaje y fusión de la vesícula con la membrana plasmática. *Véase* la Figura 12.19 para más detalles.

Los mecanismos que subyacen al desplazamiento de las vesículas de exocitosis, no están claros aún. Las evidencias actuales apuntan hacia los microtúbulos, tanto en la exocitosis, como en la endocitosis. Por ejemplo, en algunas células, las vesículas parecen desplazarse desde el complejo de Golgi hacia la membrana plasmática, a lo largo de «rieles» de microtúbulos, orientados en la dirección del desplazamiento. Es más, el movimiento se detiene si las células son tratadas con colchicina, un alcaloide vegetal que se une a los monómeros de tubulina, impidiendo su ensamblamiento. Discutiremos el movimiento de vesículas asociado a microtúbulos en el Capítulo 16.

Papel del calcio en el desencadenamiento de la exocitosis. La fusión de las vesículas de secreción regulada con la membrana plasmática, se produce generalmente por una señal extracelular. En la mayoría de los casos, la señal es una hormona o un neurotransmisor, que se une a receptores específicos de la superficie celular y activa la síntesis o liberación de un *segundo mensajero*, como analizaremos en el Capítulo 14. La elevación transitoria en la concentración de iones calcio, que se produce durante la secreción regulada, parece ser un paso esencial en la cascada de señalización, activada por receptores de membrana. La simple microinyección de calcio en el citoplasma de células del páncreas, hace que los gránulos de secreción maduros liberen su contenido al medio extracelular. Pese a todo, el papel concreto del calcio está aún por determinar, si bien parece que es responsable de la activación de quinasas de proteínas, cuyas dianas son componentes de la membrana de la vesícula o de la propia membrana plasmática.

Secreción polarizada. En muchos casos, la exocitosis de proteínas está limitada a determinadas áreas de la superficie celular. Por ejemplo, las células que tapizan la luz del intestino, descargan las enzimas digestivas sólo por la cara que mira hacia la cavidad intestinal. Hacia el lado opuesto de la célula, se segregan proteínas completamente diferentes. Este fenómeno, denominado **secreción polarizada**, se observa en las neuronas, que liberan el neurotransmisor solamente en los puntos de contacto con las otras neuronas (*véase* la Figura 13.19). Las proteínas destinadas a la secreción polarizada, así como los lípidos y proteínas de las dos capas de la membrana, se distribuyen en vesículas, que se fusionarán con subdominios precisos de la membrana plasmática.

La endocitosis facilita la importación, asociada a vesículas, de moléculas extracelulares

La mayoría de las células eucariotas llevan a cabo una o más formas de **endocitosis**. Durante este proceso, una zona limitada de la membrana se invagina progresivamente (Figura 12.13, ①) hasta que se estrangula y forma una **vesícula de endocitosis**, que contiene diferentes sustancias o partículas (② y ③). De esta forma, se consigue introducir a algunos de los materiales que estaban en el exterior de la célula (④). La exocitosis es esencial en muchos procesos celulares, como la ingesta de nutrientes o la lucha contra microorganismos.

La exocitosis y la endocitosis tienen efectos claramente opuestos, por lo que respecta al de flujo de membrana. Mientras que durante la fusión de una vesícula de exocitosis se añaden lípidos y proteínas a la membrana plasmática, en la endocitosis se pierden partes de dicha membrana. Así pues, en el estado estacionario, la composición de la membrana plasmática es una consecuencia del balance entre la exocitosis y la endocitosis. Gracias a la endocitosis y el transporte retrógrado, la célula puede recuperar moléculas que precisará para la exocitosis, como los lípidos y proteínas, que volverán de nuevo a la membrana. La magnitud del intercambio de membrana es realmente impresionante. Por ejemplo, una célula secretora del páncreas recicla una cantidad de membrana equivalente a su superficie total, cada 90 minutos. Los macrófagos (glóbulos blancos muy voluminosos) son incluso más rápidos, ¡empleando tan sólo 30 minutos!

El término endocitosis agrupa a varios procesos que difieren por la naturaleza del material ingerido y el mecanismo empleado. En cualquier caso, la membrana de la vesícula de endocitosis, aísla del citosol a las sustancias introducidas. La mayoría de las vesículas de endocitosis

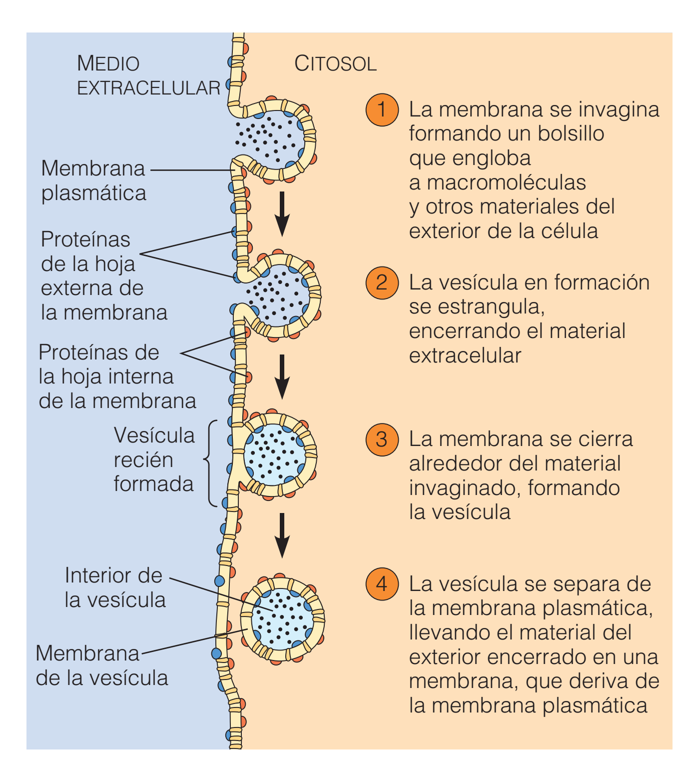


Figura 12.13 Endocitosis. Toma de materiales del exterior. Para mayor claridad, se han omitido las proteínas de la cubierta, tanto en la zona de invaginación, como alrededor de la vesícula de endocitosis. La Figura 12.15 detalla la endocitosis dependiente de clatrina.

evolucionan hacia endosomas, que se fusionan con las vesículas de la RTG, adquiriendo enzimas digestivas y madurando para formar nuevos lisosomas. Generalmente suele distinguirse entre *fagocitosis* (del griego, ingesta celular) y *pinocitosis* (bebida celular). A su vez, la pinocitosis se subdivide en endocitosis mediada por receptores —también conocida como *endocitosis dependiente de clatrina*— y *endocitosis independiente de clatrina.*

Fagocitosis. La toma de grandes partículas (>0,5 μm de diámetro), incluyendo agregados macromoleculares, partes de otras células, microorganismos e incluso otras células, se denomina **fagocitosis**. Para muchos organismos eucariotas unicelulares, como las amebas y los protozoos ciliados, la fagocitosis es una forma habitual de alimentación. En muchos animales primitivos, como los platelmintos, los celenterados y las esponjas, sigue siendo un mecanismo de uso relativamente habitual. Sin embargo, en organismos más complejos, la fagocitosis suele quedar limitada a unas células especiales, llamadas **fagocitos**. Por ejemplo, en nuestro cuerpo hay dos clases de leucocitos, que fagocitan de forma rutinaria: *neutrófilos* y *macrófagos*. Ambos tipos de células se valen de la fagocitosis para realizar funciones de defensa, más que de nutrición. Engloban y digieren los materiales extraños, así como los microorganismos invasivos, presentes en la sangre o en tejidos erosionados. Los macrófagos pueden actuar, además, como «rastreadores», ingiriendo restos celulares presentes en la sangre. En ciertas circunstancias hay otras células de mamíferos capaces de fagocitar. Por ejemplo, los fibroblastos del tejido conjuntivo, pueden fagocitar colágeno, para remodelar el tejido y las células dendríticas del bazo, fagocitan bacterias, como parte de la respuesta inmune.

La fagocitosis se ha estudiado en detalle en las amebas. La superficie de la mayoría de estas células está rodeada por una cubierta, de glicosaminoglicanos, en la que éstos pueden formar prolongaciones finas, que adsorben y atrapan alimentos, partículas u organismos más pequeños. El contacto con las dianas apropiadas, desencadena la respuesta fagocítica que se muestra en la Figura 12.14. La actina polimeriza haciendo que la membrana desarrolle repliegues

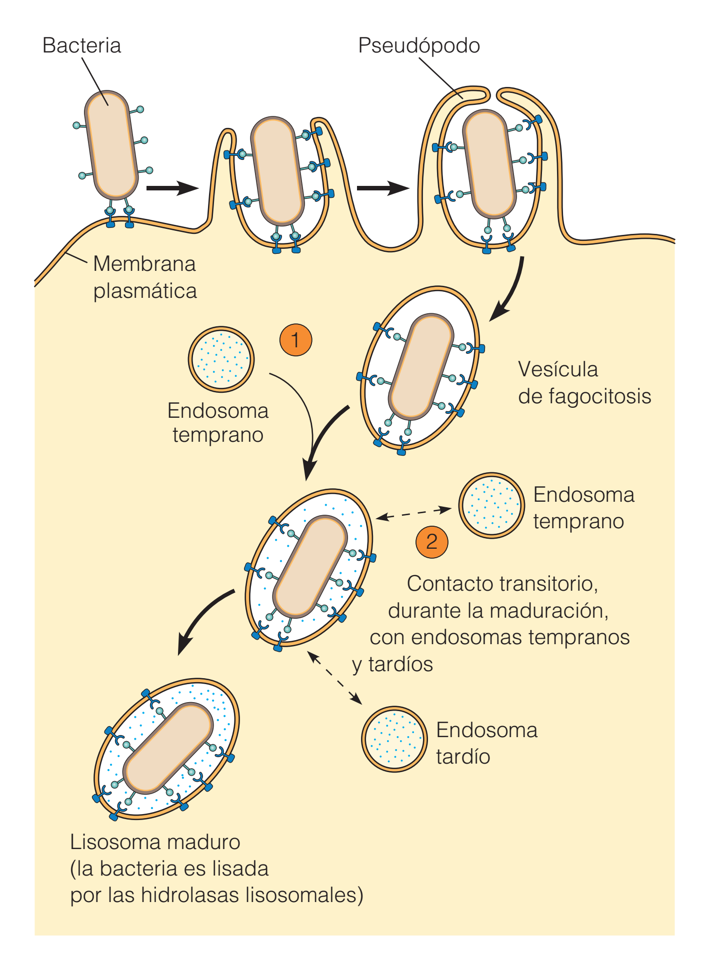


Figura 12.14 Fagocitosis. La unión de partículas o microorganismos a los receptores de la superficie celular, desencadena el inicio de la fagocitosis. La membrana desarrolla unos repliegues llamados *pseudópodos*, cuya formación depende la polimerización de actina, que engloban a la partícula. Finalmente, los bordes del pseudópodo se encuentran y se forma una *vacuola fagocítica*. Posteriormente, la vacuola se fusiona ① con un endosoma temprano o se conecta ② transitoriamente (indicado por las líneas de puntos) con endosomas tempranos y tardíos, madurando para dar lugar a un lisosoma, en el cual se digiere el material interiorizado.

denominados *pseudópodos*, que rodean progresivamente al objeto. Finalmente los pseudópodos se encuentran y encierran a la partícula, formando una **vacuola fagocítica** intracelular. Esta vesícula, llamada también *fagosoma*, se fusiona posteriormente con un endosoma tardío o madura directamente hacia lisosoma, formando una gran vacuola en la que se digiere el material capturado. En las vacuolas fagocíticas de los macrófagos, con el fin de aumentar la capacidad de destruir a los microorganismos, se generan varios oxidantes, como el peróxido de hidrógeno o el ácido hipocloroso.

Endocitosis mediada por receptores. Denominada también **endocitosis dependiente de clatrina**, permite la concentración e ingestión de moléculas extracelulares, gracias a la presencia de receptores específicos en la superficie externa de la membrana. (Aunque la fagocitosis está también mediada por receptotes, en ella no se concentran sustancias, ni es dependiente de clatrina.) La endocitosis mediada por receptores es el mecanismo más importante de introducción de la mayoría de las macromoléculas, en las células eucariotas. Según el tipo celular, las células de mamíferos pueden ingerir, por este sistema, hormonas, factores de crecimiento, enzimas, proteínas séricas, anticuerpos, hierro e incluso algunos virus y toxinas bacterianas.

El descubrimiento de la endocitosis mediada por receptores y su papel en la entrada de las *lipoproteínas de baja densidad* (*LDL*), se analiza en el Anexo 12B. La endocitosis de LDL permite la entrada de colesterol en las células de mamíferos. Su interés por el estudio de la hipercolesterolemia familiar, predisposición hereditaria a tener elevados niveles de colesterol en sangre y, por tanto a la aterosclerosis y dolencias cardíacas, permitió a Michael Brown y Joseph Goldstein descubrir la endocitosis mediada por receptores, hecho por el cual compartieron el Premio Nobel en 1986.

El proceso se ilustra en la Figura 12.15. Comienza con la unión de las moléculas de ligando a sus respectivos receptores de la superficie externa de la membrana plasmática (①). Conforme el complejo receptor-ligando va desplazándose por la membrana, puede encontrarse con unas regiones especializadas —denominadas *fosas cubiertas*— que sirven como lugares de recolección y entrada de tales complejos (②). En una célula típica de un mamífero, las fosas cubiertas representan aproximadamente el 20% de la superficie total de la membrana plasmática. La acumulación de los complejos receptor-ligando en las fosas cubiertas, facilita la reunión de proteínas adicionales —proteínas adaptadoras, clatrina y dinamina— requeridas para que la membrana se incurve, iniciándose la invaginación (③). Estas proteínas se disponen en la cara interna de la membrana plasmática. La invaginación continúa hasta que la vesícula se estrangula y libera, formando una **vesícula cubierta** (④). Inmediatamente, la cubierta de clatrina se libera, quedando la vesícula desnuda (⑤). Las proteínas de la cubier-

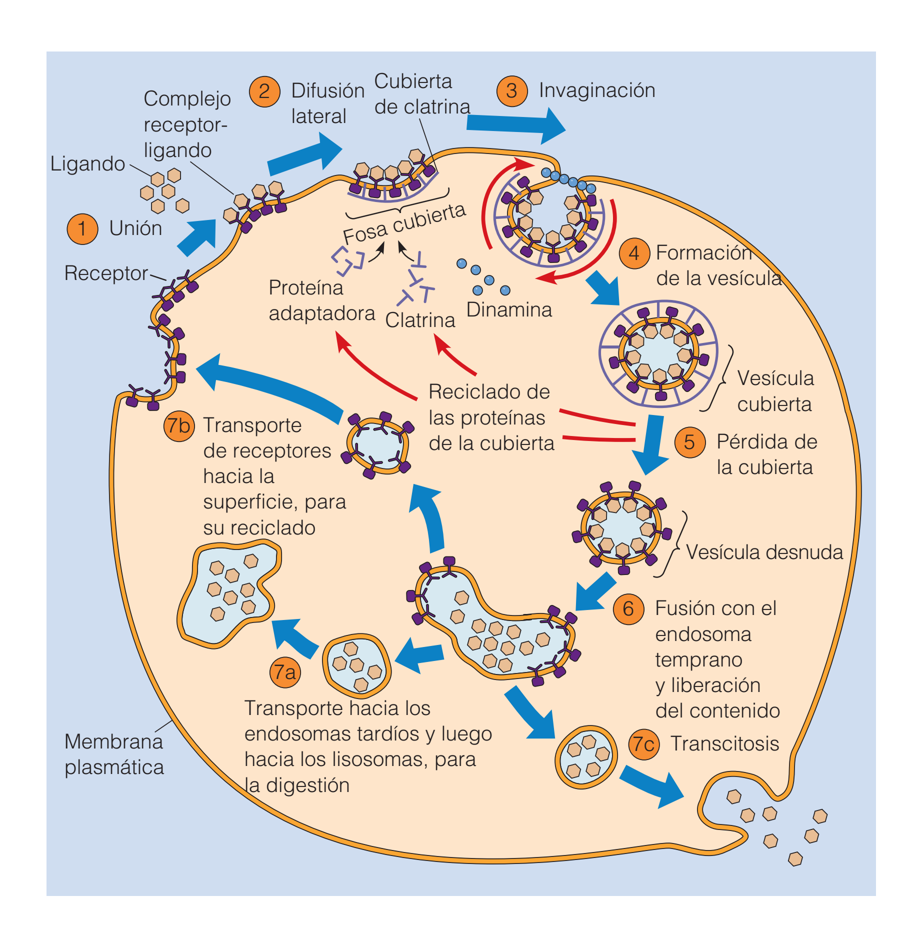


Figura 12.15 Endocitosis mediada por receptores. En este esquema de la endocitosis mediada por receptores, las moléculas a introducir, ① se unen a receptores específicos de la membrana plasmática. ② Los complejos receptor-ligando se acumulan en fosas cubiertas ③, en las que la proteína adaptadora clatrina y la dinamina, ambas en la cara citosólica de la membrana, facilitan la invaginación. Como resultado se forma una vesícula cubierta ④ que se desnuda rápidamente ⑤. La vesícula, ahora descubierta, puede fusionarse ⑥ con otras membranas intracelulares, generalmente la de un endosoma temprano, en el cual se clasifica el material introducido. El destino de los receptores y ligandos, depende de la naturaleza del material ingerido. Las vesículas de transporte (7a) llevan el material a los endosomas tardíos, para su digestión. Las rutas alternativas son el reciclado hacia la membrana plasmática (7b) o el transporte y exocitosis por otra región de la membrana (7c) (proceso denominado transcitosis).

ta y la dinamina se reciclan de vuelta hacia la membrana, donde están en disposición de formar nuevas vesículas, mientras que la vesícula de endocitosis puede fusionarse con un endosoma temprano (⑥). La velocidad y cobertura de la endocitosis mediada por receptores es impresionante. Una fosa cubierta se suele invaginar un minuto después de iniciar su formación y se ha estimado que, un fibroblasto en cultivo, puede formar hasta 2.500 vesículas por minuto. La Figura 12.16 muestra un oocito de pollo capturando partículas de vitelo en una fosa cubierta y cómo evoluciona ésta hasta formar una vesícula cubierta. En la siguiente sección analizaremos el papel de las proteínas de la cubierta en la formación y transporte de las vesículas.

Existen formas alternativas de endocitosis mediada por receptores. El factor de crecimiento epidérmico (EGF), por ejemplo, sigue el patrón de la Figura 12.15. Los receptores del EGF se reúnen en las fosas cubiertas, después de que se hayan formado los complejos receptor-ligando. En otros casos, los receptores residen permanentemente en las fosas cubiertas. En estos casos, la unión del ligando es la señal que activa el proceso de invaginación. En otra variante, los receptores, no sólo residen en la fosa cubierta, sino que se produce constitutivamente la endocitosis, con independencia de que se hayan unido o no los ligandos. Por ejemplo, los receptores de las LDL, que se describen en el Anexo 12B, se introducen de forma constitutiva.

Después de la endocitosis asistida por receptores, las vesículas descubiertas se fusionan con las que emanan de la RTG, formando los endosomas tempranos, que se localizan en la periferia de la célula. Los endosomas tempranos son estructuras de clasificación y reciclado del material extracelular, tomado por endocitosis. Las moléculas proteicas necesarias para subsiguientes ciclos de endocitosis, a menudo —aunque no siempre— se reciclan, después de que hayan sido separadas del material destinado a la digestión. Los lisosomas tempranos continúan adquiriendo proteínas lisosomales provenientes de la RTG, madurando hacia endosomas tardíos, que, por último, terminan en lisosomas. Las funciones de los endosomas en los procesos de digestión celular, se examinarán más adelante, en este mismo capítulo.

El reciclado de los receptores se consigue por la acidificación de los endosomas tempranos. El interior de una vesícula de endocitosis tiene valores de pH en torno a 7,0, mientras que en el endosoma, se sitúa entre 5,9 y 6,5. La bajada de pH se consigue gracias a la presencia de una *bomba de protones dependiente de ATP*, presente en la mem-

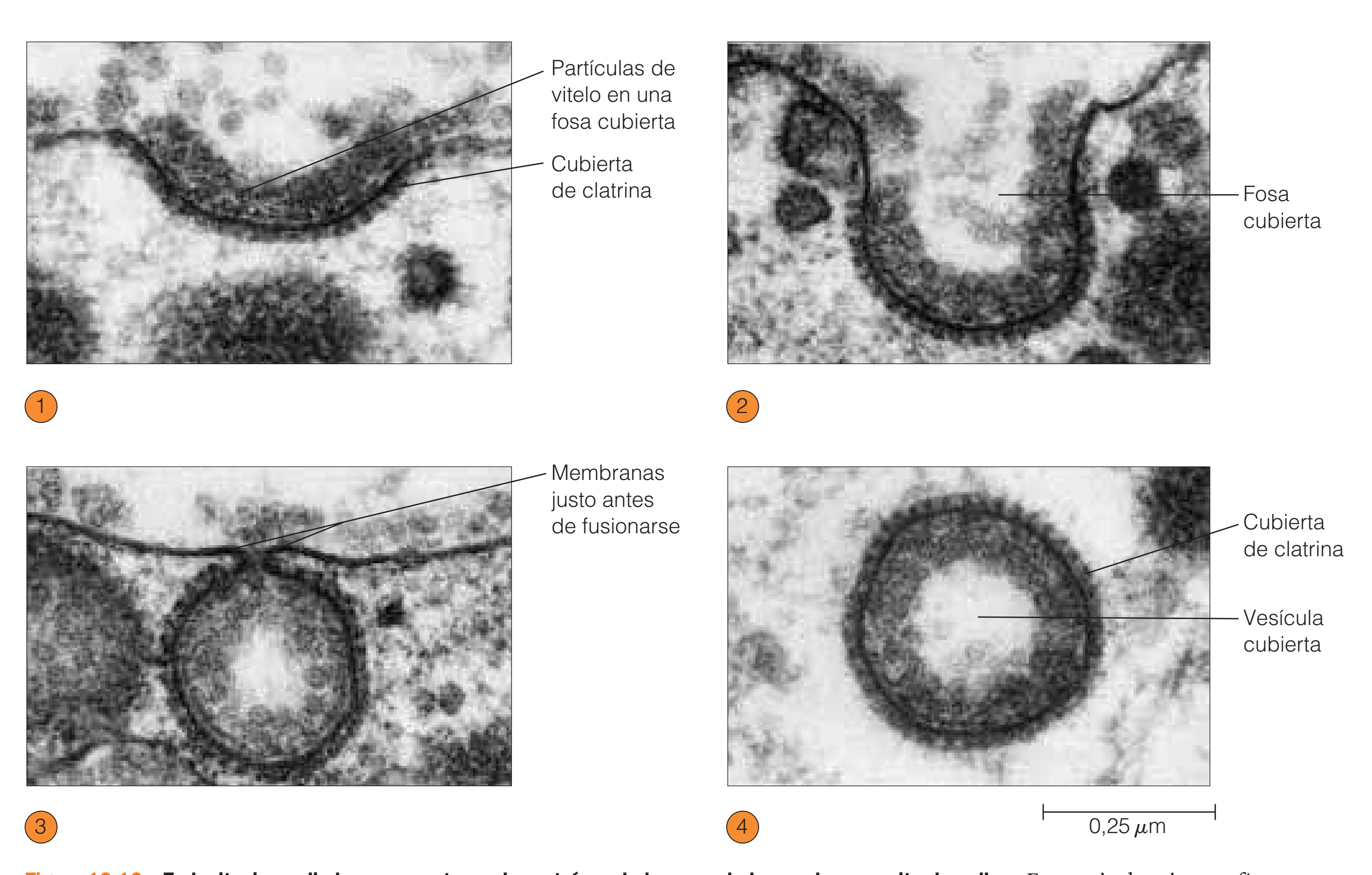


Figura 12.16 Endocitosis mediada por receptores de proteínas de la yema de huevo de un oocito de pollo. Esta serie de micrografías electrónicas resumen la formación de una veícula cubierta, a partir de una fosa cubierta, durante la endocitosis mediada por receptores. Las partículas de vitelo ① se acumulan en una fosa cubierta, que aparece como una ligera invaginación de la membrana ② asociada a la presencia de clatrina en la cara interna. ③ Estadio final de formación de la vesícula cubierta, justo antes del estrangulamiento del cuello de la vesícula. ④ Vesícula cubierta recién formada, en la que persiste aún la cubierta de clatrina.

El colesterol, el receptor de LDH y la endocitosis mediada por receptores

La endocitosis mediada por receptores (EMR) es la forma en que las células eucariotas capturan macromoléculas específicas, con alta eficacia. Con este sistema se pueden tomar macromoléculas de muy diversos tipos, cada una de ellas reconocidas por receptores específicos de la membrana plasmática. Sin embargo, cuando se analiza el descubrimiento de la EMR, las descripciones se centran en un receptor específico, relacionado con un problema de salud que nos concierne: los niveles de colesterol en sangre.

Como debe saber, uno de los principales factores de predisposición al infarto cardíaco son los niveles anormalmente altos de colesterol en el suero sanguíneo, condición conocida como *hipercolesterolemia*. Dada la insolubilidad del colesterol en el suero, éste tiende a depositarse en el interior de las paredes de los vasos sanguíneos. Los depósitos van aumentando con el tiempo, dando lugar a las *placas ateroscleróticas*, que causan la *aterosclerosis*, comúnmente conocida como endurecimiento de las arterias. Al final, las placas llegan a bloquear el flujo sanguíneo, causando infartos cerebrales o cardíacos. Recuérdese que, pese a todo, el colesterol es un componente de la membrana de las células animales —así pues, e requieren unos niveles moderados de colesterol— y que el organismo sintetizará colesterol, si la ingesta del mismo es insuficiente.

Aunque los niveles de colesterol en sangre altos están a menudo ligados a la ingesta del propio colesterol y de ácidos grasos, ciertas personas tienen predisposición genética a la hipercolesterolemia y, por tanto, a la aterosclerosis y ataques cardíacos. Esta predisposición hereditaria, conocida como **hipercolesterolemia familiar** (**HF**) es especialmente severa en los individuos homozigotos —es decir, aquellos que han heredado un gen HF deficiente de cada parental—. Las personas afectadas de HF presentan elevados niveles de colesterol sérico (unos 650-1.000 mg/100 mL de suero sanguíneo, frente a los valores normales de 130-200 mg/mL) y desarrollan la aterosclerosis muy pronto, falleciendo de dolencias cardíacas, a menudo, antes de los 20 años. Los heterozigotos —aquellos que tienen una copia deficiente y otra normal del gen— se ven menos afectados, pese a lo cual sus niveles de colesterol en sangre son elevados (unos 250-500 mg/100 mL) y tienen un riesgo alto de sufrir ataques al corazón a partir de los treienta años.

La relación entre la HF y la EMR se dio a conocer en 1972, gracias a un estudio de Michael Brown y Joseph Goldstein, que les supuso además, el Premio Nobel, en 1986. Brown y Goldstein empezaron por cultivar fibroblastos de pacientes afectados de HF, comprobando que sintetizaban colesterol con una tasa anormalmente alta. Su siguiente observación clave fue que las células normales también sintetizaban cantidades anormalmente elevadas de colesterol, cuando eran privadas de las **lipoproteínas de baja densidad** (**LDL**), usualmente presentes en el medio de cultivo. Las LDLs permiten el transporte de colesterol en sangre y pueden ser tomadas por las células.

Las LDLs son unas de las muchas *lipoproteínas sanguíneas*, que se clasifican de acuerdo a su densidad. Otro tipo son las **lipoproteínas de alta densidad** (**HDL**), cuyos niveles moderados en sangre se consideran saludables. Una partícula de lipoproteína es, en esencia, una monocapa de moléculas de fosfolípidos y colesterol y una o más moléculas proteicas, en la que los lípidos se orientan con sus cabezas polares hacia el exterior (el medio acuoso) y las colas, hacia el interior de la partícula (Figura 12B.1). Las LDLs son las lipoproteínas que más colesterol contienen: el colesterol, libre o esterificado, constituye en peso, más de la mitad de la partícula. Las formas esterificadas del colesterol protan una larga cadena de ácido graso, por lo que son muy hidrófobas. En cantidades de unas 1.500 moléculas por partícula, tienden a agruparse en el interior de la misma, mientras que el colesterol libre (unas 500 moléculas por partícula) se sitúa principalmente en la monocapa lipídica (Figura 12B.1).

Además de fosfolípidos y colesterol, cada partícula de LDL lleva, embebida en la monocapa lipídica, una molécula de una proteína muy voluminosa, denominada *apoproteína B100*. Esta proteína es crucial para la comprensión de las diferencias en las respuestas de las células FH y las normales, ante la presencia de LDL en el medio. Brown y Goldstein comprobaron que la capacidad de los fibroblastos de mantener una tasa relativamente baja de síntesis de colesterol, dependía de la presencia de LDLs en el medio, circunstancia que les permitió suponer que las LDLs estaban implicadas en el transporte de colesterol, el cual regularía su propia síntesis por *inhibición* (o *retroinhibición*) *alostérica* (*véase* Figura 6.16). Los fibroblastos FH, por otra parte, sintetizan colesterol en cantidades elevadas, independientemente de que haya o no LDLs en el medio, lo cual sugiere que estas células podrían ser deficientes en la toma de colesterol dependiente de LDLs.

Basándose en estas observaciones, Brown y Goldstein propusieron que la toma de colesterol por las células, requiere la presencia de un receptor específico en la superficie de la célula y que dicho receptor sería deficiente o faltaría en los pacientes con HF. En una serie brillante de experimentos, estos investigadores y sus colaboradores, demostraron la existencia de una proteína específica de membrana, el **receptor de LDL**, y que éste reconocía a la apoproteína B100 presente en cada partícula de LDL. Asimismo comprobaron que las células de los pacientes con HF, o bien carecían del receptor, o bien éste presentaba alguna anomalía.

brana del endosoma. El ambiente ligeramente ácido produce una disminución en la afinidad de la mayoría de los complejos receptor-ligando (por ejemplo, LDL y su receptor); los receptores pueden ahora reciclarse hacia la membrana, mientras que el material ingerido alcanzará otros destinos.

El reparto no es siempre algo tan sencillo como enviar a los receptores a la membrana y retener a los ligandos en

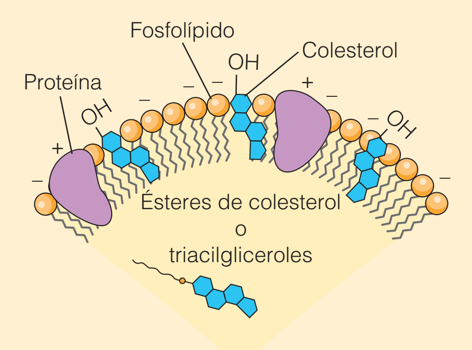


Figura 12.B1 Estructura de las LDL. Una partícula lipoproteica típica está formada por una monocapa de fosfolídidos y moléculas de colesterol libres (no esterificadas), que rodean a un interior hidrófobo. En la monocapa se insertan una o más moléculas proteicas. Las moléculas de colesterol esterificadas por ácidos grasos de cadena larga, son muy hidrófobas y tienden a agruparse en el interior de la lipoproteína. Éstas difieren entre sí por su densidad, que depende de la proporción relativa de lípidos y proteínas. Dado que los lípidos son menos densos que las proteínas, la densidad de la partícula es inversamente proporcional a la cantidad de lípidos que posea. La lipoproteína mostrada aquí es de baja densidad (LDL), con un valor de 1,02-1,06 g/ml. Una partícula LDL típica tiene unas 800 moléculas de fosfolípido y 500 de colesterol libre, en la monocapa y unas 1.500 de colesterol esterificado en el interior. La única proteína presente, denominada apoproteína B-100, tiene un peso molecular de unos 500.000 y está insertada en la monocapa lipídica. La proteína confiere estabilidad estructural a la partícule e interviene en la unión de la LDL a los receptores específicos de la superficie de las células.

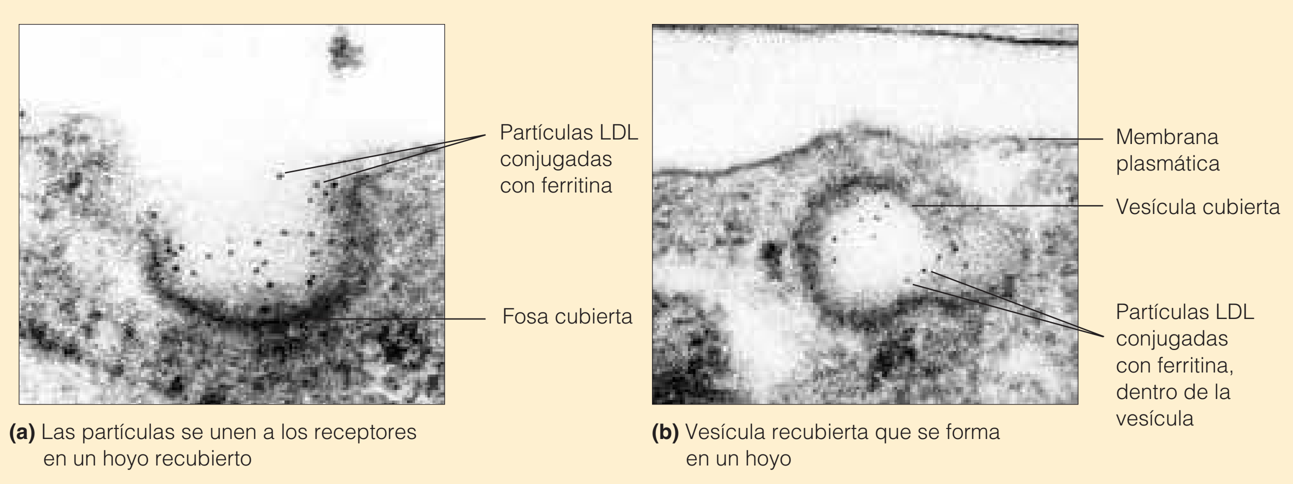


Figura 12.B2 Unión a la membrana de las partículas LDL. La conjugación de partículas LDL con la proteína ligadora de hierro, ferritina, permite observar estas partículas en el microscopio electrónico, debido precisamente a la electrodensidad de los átomos de hierro. (**a**) Los conjugados de LDL-ferritina aparecen como motas oscuras, unidas a receptores concentrados en una fosa cubierta, de un fibroblasto humano en cultivo. (**b**) El conjugado LDL-ferritina se internaliza cuando se forma una vesícula cubierta en la región correspondiente a la fosa cubierta (TEMs).

Para observar las partículas de LDL, estos científicos las conjugaron con moléculas de ferritina, proteína que liga átomos de hierro. Dado que los átomos de hierro son densos a los electrones, aparecen como puntos oscuros en el microscopio electrónico (Figura 12B.2). Sirviéndose de esta técnica, Brown y Goldstein demostraron que las partículas de LDL conjugadas con ferritina, se unián a la superficie de la célula, acumulándose en lugares precisos (Figura 12B.2a). Hoy día conocemos a dichos lugares como *fosas cubiertas*, que son territorios de la membrana, caracterizados por la presencia de clatrina, hacia la cara citoplásmica y de un acúmulo de complejos receptor-ligando, en el exterior de la membrana.

Se vio también la presencia de los puntos oscuros en el interior de las veículas formadas por invaginación y posterior estrangulamiento de las fosas cubiertas (Figura 12B.2b). En otras palabras, que el receptor no sólo reconoce a la LDL, sino que parecía intervenir también en su internalización en vesículas. En suma, estos investigadores habían descubierto un nuevo mecanismo por el que las células toman macromoléculas del medio. Y como era un proceso de endocitosis en el que estaban mediados receptores, lo denominaron con el nombre que lo conocemos hoy día, endocitosis mediada por receptores.

el endosoma. Algunos complejos receptor ligando no se disocian en el endosoma temprano. Los ligandos disociados son destinados a los lisosomas, pero aquellos que permanecen unidos a los receptores, requieren ser diferidos hacia vesículas de transporte. Existen, al menos, tres alternativas: (1) Algunos complejos receptor-ligando (por ejemplo, el factor de crecimiento epidérmico y su receptor) son dirigidos hacia los lisosomas, para su degradación. (2) Otros son

conducidos hacia la RTG, donde se integran en diferentes rutas de transporte del sistema de endomembranas. (3) Los complejos pueden también viajar, en vesículas de transporte, hacia diferentes regiones de la membrana plasmática, donde se segregan como parte del proceso conocido como **transcitosis**. La trancitosis posibilita la transferencia de material extracelular desde un lado de la célula (endocitosis) hasta el lado opuesto (exocitosis). De esta forma, se transfieren las inmunoglobulinas, a través de células epiteliales, desde la sangre de la madre a la sangre del feto.

Endocitosis independiente de clatrina. Un ejemplo de endocitosis independiente de clatrina, es el de la ruta conocida como endocitosis de fase fluida, que es una variedad de pinocitosis no específica de fluidos extracelulares. La endocitosis de fase fluida, a diferencia de la endocitosis mediada por receptores, no concentra el material ingerido. Dado que no hay un mecanismo de recolección o exclusión específicas, lo que se introduce es un reflejo de lo que hay en el medio extracelular. Los componentes de la membrana plasmática, como por ejemplo los receptores, pueden ser incluidos indiscriminadamente, en vesículas de endocitosis de fase fluida. A diferencia de otras formas de endocitosis, ésta acontece de forma más o menos continua, con una tasa constante y, en muchas células, posiblemente constituye el mecanismo primordial de compensación de las ganancias de membrana, que son consecuencia de la exocitosis. Así pues, puede ser una forma de control de la superficie y volumen celulares. Una vez dentro de la célula, las vesículas de fase fluida, al igual que las de la endocitosis dependiente por clatrina, son conducidas a los endosomas tempranos.

Las vesículas cubiertas en los procesos celulares de transporte

Las vesículas cubiertas fueron descritas por primera vez por Thomas Roth y Keith Porter, en 1964, con relación a su papel en la captura de las proteínas de la yema en los oocitos de mosquito. Desde entonces se ha comprobado que son vitales en múltiples procesos celulares. Anteriormente hemos visto que las vesículas cubiertas y sus precursores, las fosas cubiertas, están implicadas en el transporte de vesículas en el sistema de endomembranas, así como durante la endocitosis y la exocitosis. Es probable que estas vesículas participen en la mayoría, sino en todas, las formas de tráfico de vesículas que, en las células eucariotas, relacionan a los orgánulos de membrana con la membrana plasmática.

Una característica común de las vesículas cubiertas es la presencia de una capa de proteínas, o cubierta, hacia el lado citoplásmico de la membrana vesical. Como se indicó anteriormente, las proteínas de la cubierta más estudiadas son *clatrina*, *COPI* y *COPII*. Una cuarta, y peor conocida proteína, es la *caveolina*. Las proteínas de la cubierta participan en varias de las etapas de formación de las vesículas de transporte. La diversidad de estas proteínas es el reflejo de su participación en la clasificación de diferentes moléculas, con destinos particulares, que viajan en vesículas específicas. Entre las principales funciones se encuentran la de deformar las membranas planas, para forzar la gemación, prevenir la fusión prematura con las membranas próximas de una vesícula en formación y regular las interacciones entre las vesículas en gemación y los microtúbulos, que son esenciales para el desplazamiento de las vesículas por la célula.

La dotación particular de proteínas del exterior de una vesícula, es un indicador de su origen y destino en la célula (Tabla 12.2). Como ya sabemos, las *vesículas con cubiertas de clatrina*, están implicadas en el transporte de proteínas desde la RTG a los endosomas y en la endocitosis de complejos receptor-ligando de la membrana plasmática. Las *vesículas de COPI*, por su parte, facilitan el transporte de retorno de proteínas desde el Golgi hacia el RE, así como el intercambio entre cisternas del propio complejo de Golgi. Las *vesículas de COPII* permiten el transporte de material desde el RE al Golgi. El papel de las *vesículas cubiertas de caveolina*, denominadas *caveolas*, es aún controvertido. Se forman caveolas transitorias en la membrana y el material endocitado aparece en los endosomas, pero la ruta de conexión entre la membrana plasmática y los endosomas, es aún poco clara.

Las vesículas cubiertas de clatrina están rodeadas por redes de clatrina y proteínas adaptadoras

Las vesículas de clatrina están rodeadas por cubiertas compuestas por dos proteínas multiméricas, **clatrina** y pro-

Tabla 12.2 Vesículas cubiertas de células eucariotas

Vesícula cubierta	Proteínas de la cubierta*	Origen	Destino
Clatrina	Clatrina, AP1, ARF	TGN	Endosomas
Clatrina	Clatrina, AP2	Membrana plasmática	Endosomas
COPI	COPI, ARF	Complejo de Golgi	RE o complejo de Golgi
COPII	COPII (Sec13/31 y Sec23/24), Sar1	RE	Complejo de Golgi
Caveolina	Caveolina	Membrana plasmática	?

*ARF es el factor de ribosilación de ADP; AP1 y AP2 son complejos proteicos adaptadores (también llamados complejos proteicos de ensamblaje).

teínas **adaptadoras (AP)**. El término clatrina proviene del latin *clathratus*, que significa «malla» y como se puede comprobar en la Figura 12.17, la clatrina y la AP se ensamblan formando mallas poligonales. Las mallas planas están constituidas exclusivamente por hexágonos, mientras que en las mallas curvas, que se forman bajo las fosas cubiertas y alrededor de las vesículas, hay, tanto hexágonos, como pentágonos.

Las vesículas cubiertas de clatrina se disocian rápidamente en complejos de clatrina solubles, complejos de proteínas adaptadoras y vesículas desnudas. Estos elementos, a su vez, pueden reensamblarse, bajo las condiciones apropiadas. En soluciones ligeramente ácidas y con iones Ca^{2+}, los complejos de clatrina se arman, independientemente de la presencia de proteínas adaptadoras y vesículas, formando unos caparazones denominados *cajas* de *clatrina*. El ensamblaje se produce muy rápidamente —apenas unos segundos, en condiciones favorables—. El ensamblaje y desensamblaje rápido es una característica esencial de la cubierta, pues parece que es necesario que ésta desaparezca, total o parcialmente, antes de que se produzca la fusión de la vesícula con una membrana.

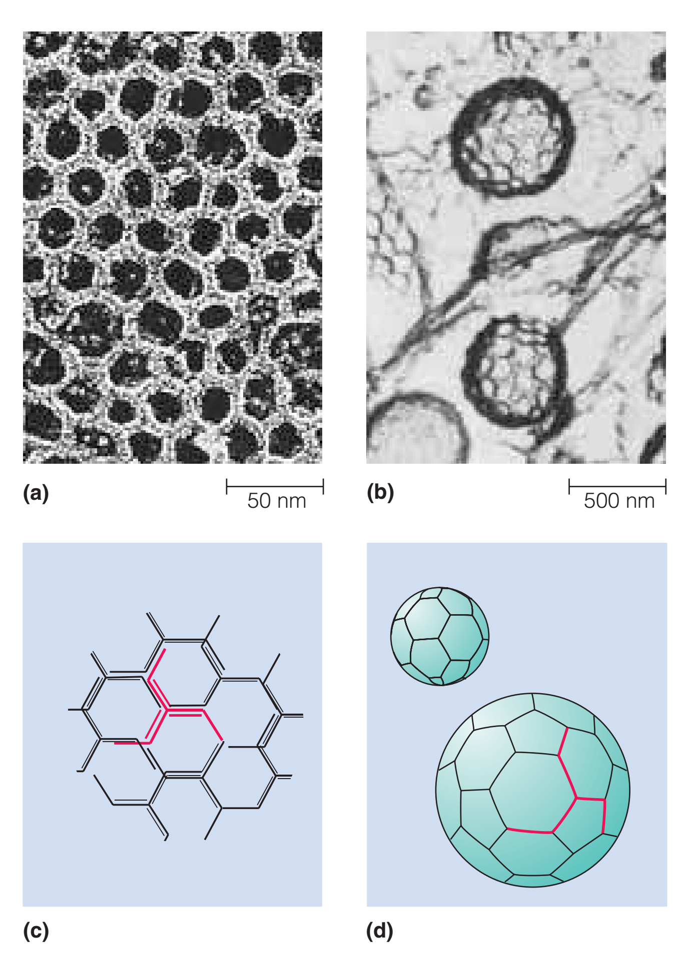
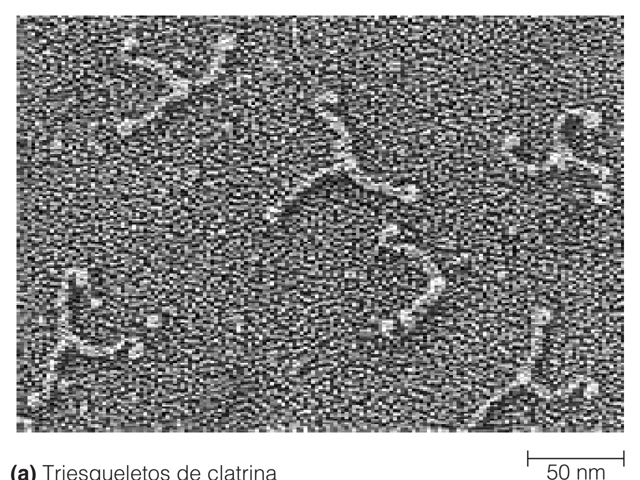


Figura 12.17 Redes de clatrina. Las vesículas cubiertas de clatrina intervienen en múltiples procesos de transporte en las células eucariotas. Cada vesícula se rodea de una jaula de complejos de clatrina enlazados. (**a**) Micrografía electrónica de criograbado de una red de clatrina de una célula de un carcinoma humano. Esta red plana está formada por unidades hexagonales. (**b**) Micrografía electrónica de jaulas de clatrina, pentagonales y hexagonales, aisladas de cerebro bovino (TEMs). (**c**) y (**d**) Interpretación esquemática de las redes y jaulas de clatrina de las figuras (a) y (b).

Componentes de las mallas de clatrina. En 1981, Ernst Ungelwickell y Daniel Branton determinaron que la unidad estructural básica de las redes de clatrina, era un elemento formado por tres brazos, denominado **triesqueleto** (Figura 12.18a). Cada triesqueleto es una proteína multimérica formada por tres polipéptidos grandes y tres pequeños, que confluyen en un punto central, como se aprecia en la Figura 12.18b. Los polipéptidos mayores, cada uno con un peso molecular de 192.000, son las *cadenas pesadas de clatrina* y forman los brazos del triesqueleto. Cada brazo está ligeramente curvado en su mitad, el codo, y finaliza con un dominio globular. Los polipéptidos menores, con un peso molecular en el rango de 30.000 a 36.000, son las *cadenas ligeras de clatrina*. Los anticuerpos dirigidos contra las cadenas ligeras se unen a los brazos cerca del vértice central, lo cual indica que se asocian a la región interna de cada brazo.

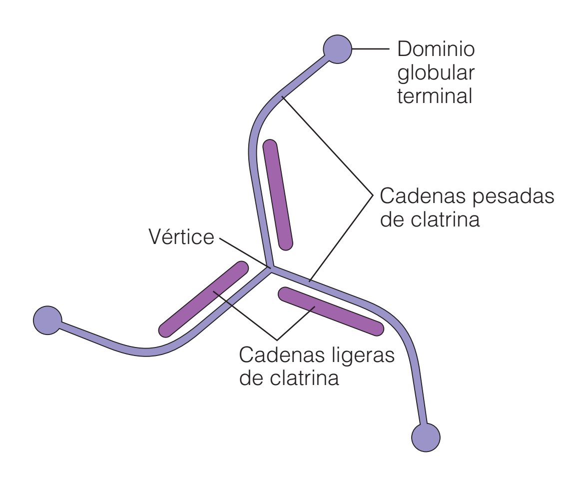
Combinando la información obtenida por microscopía electrónica y cristalografía de rayos X, se ha establecido el modelo de organización característico de hexágonos y pentágonos de las fosas y vesículas de clatrina (Figura 12.18c). Según dicho modelo, en cada vértice de la malla poligonal, se sitúa un triesqueleto. Cada brazo se extiende en dos lados del polígono, coincidiendo el codo con un vértice adyacente. Dado que los codos de las cadenas pesadas se sitúan en los vértices contiguos, en cada lado de la malla de clatrina, se superponen los brazos de tres triesqueletos. Esta disposición en redes superpuestas, asegura un alto grado de contacto entre los polipéptidos de clatrina. Tales contactos confieren la resistencia mecánica apropiada para la formación de la vesícula. Por otra parte, en los codos no se produce interacción, lo que confiere la flexibilidad necesaria para formar, tanto hexágonos, como pentágonos y facilitar el acomodo para vesículas de diferentes tamaños.

El otro componente básico de las cubiertas de clatrina —las *proteínas adaptadoras*, PA— fue identificado en base a su capacidad para promover el ensamblaje de la cubierta; ésta es la razón por la cual son también conocidas como *proteínas de ensamblaje*. Hoy día se sabe que las células eucariotas tienen, al menos, cuatro tipos de complejos PA, cada uno compuesto por cuatro polipéptidos —dos subunidades de adaptina, una cadena intermedia y una cadena pequeña—. Los cuatro polipéptidos, que son ligeramente distintos en cada tipo de complejo PA, se unen a diferentes receptores transmembrana, confiriendo especificidad a la vesícula, durante su formación y para encontrar su destino. Además de asegurar la reunión de las moléculas apropiadas en las fosas cubiertas, los complejos PA intervienen también en el anclaje de la clatrina a la membrana plasmática. Considerando estas funciones, no es de extrañar que los

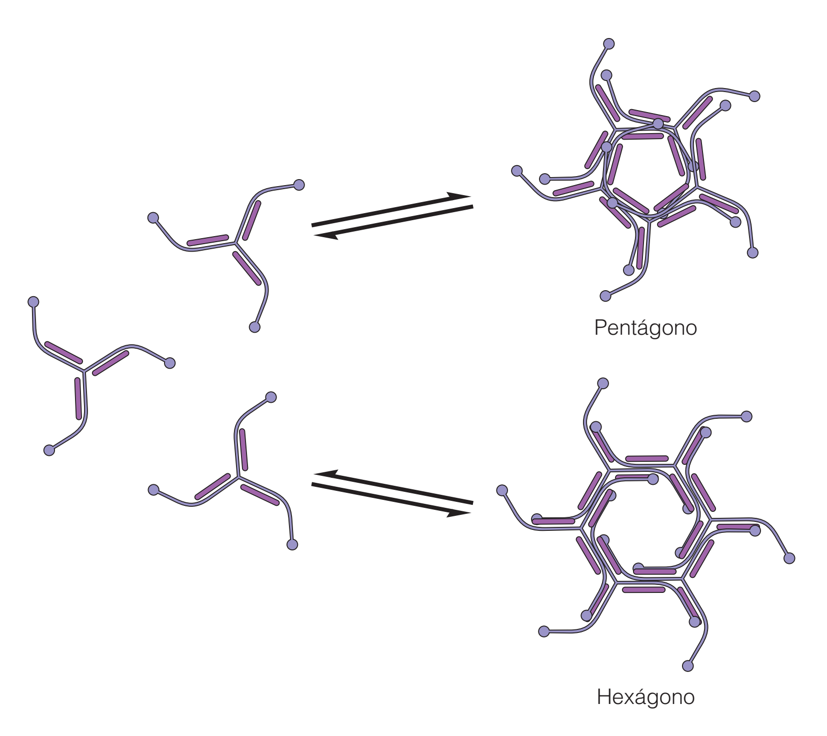




(a) Triesqueletos de clatrina



(b) Estructura del triesqueleto de clatrina



(c) Modelo de ensamblaje de triesqueletos de clatrina

Figura 12.18 Triesqueletos de clatrina. (**a**) Esta micrografía muestra esqueletos individuales de clatrina (SEM). (**b**) Cada triesqueleto está formado por tres cadenas pesadas de clatrina, que irradian desde un vértice central, cada una de ellas rematada por un dominio globular y una cadena ligera de clatrina unida a la mitad interna de cada una de los radios (no se muestran los complejos proteicos adaptadores, presentes también en las cubiertas de clatrina). (**c**) Cuando las condiciones son apropiadas, los triesqueletos de clatrina se ensamblan en estructuras pentagonales y hexagonales, propias de fosas y vesículas cubiertas. De acuerdo con el modelo que se presenta aquí, un triesqueleto de clatrina se localiza en el vértice de un poliedro y cada brazo se asocia en paralelo con cada uno de los brazos de los dos triesqueletos vecinos.

complejos PA sean sujetos de regulación del ensamblaje y disolución de la clatrina. Así, la capacidad de unión de los complejos PA a la clatrina, se ve afectada por el pH, la fosforilación y la defosforilación.

El ensamblaje de las cubiertas de clatrina dirige la formación de vesículas en la membrana plasmática y en la RTG

Tanto la unión de los complejos PA a la membrana plasmática, como la concentración de los receptores, o complejos receptor-ligando, en las fosas cubiertas, precisan de ATP y GTP —si bien, quizá sólo para regular el proceso. Sin embargo, el ensamblaje de las cubiertas de clatrina alrededor de las vesículas, puede tener lugar sin necesidad de que se adicione más ATP o GTP, excepto en las vesículas de la RTG, que requieren la hidrólisis de nucleótidos trifosfato.

La acumulación de los triesqueletos y el ensamblaje de la cubierta en la cara citosólica de una membrana, parecen conferir parte de la fuerza motriz necesaria para formar una vesícula. En el caso de la endocitosis mediada por receptores, la formación de la red de clatrina en la cara interna de la membrana, hace que ésta se invagine. Inicialmente todas las unidades de clatrina son hexágonos dispuestos en un plano, es decir, forman una estructura bidimensional. Conforme se van incorporando más triesqueletos, aparecen configuraciones pentagonales, que junto con los hexágonos promueven la curvatura y gemación de la vesícula.

Paralelamente a la acumulación de clatrina alrededor de la vesícula en formación, se incorpora, al menos, una nueva proteína, la **dinamina**. Esta GTPasa citosólica, que se identificó por primera vez en *Drosophila*, interviene en el estrangulamiento y liberación de la vesícula. Las moscas que presentaban una forma de la dinamina sensible a temperatura, se paralizaban de inmediato tras un cambio térmico. Posteriormente se comprobó, que en las moscas afectadas, se producía una acumulación de fosas cubiertas en las membranas presinápticas de las uniones neuromusculares. La unión del GTP, posiblemente facilita la formación de anillos helicoidales alrededor del cuello de la fosa cubierta en gemación. Cuando se hidroliza el GTP, los anillos se contraen, y se separa de la membrana una vesícula perfectamente sellada.

Se precisa también algún tipo de mecanismo para *descubrir* las membranas recubiertas de clatrina. Es más, este proceso debe estar regulado, pues la cubierta permanece durante la formación de la vesícula, pero se disocia instantes más tarde. Al igual que la formación, la disgregación de la cubierta es un proceso que consume energía, estimada en unos tres ATPs por triesqueleto disociado. Se requiere como mínimo una proteína, la *GTPasa liberadora de la cubierta*, que separa los triesqueletos de clatrina de los complejos PA; aún no se han aislado los factores responsables de la separación entre los complejos adaptadores y la membrana.

Las vesículas cubiertas de tipo COPI y COPII, conectan el RE y las cisternas del complejo de Golgi

Las vesículas cubiertas de COPI están presentes en todas las células eucariotas analizadas, desde levaduras a mamíferos, pasando por los insectos. Las cubiertas están integradas por COPI y el **factor de ribosilación de ADP** (**ARF**). Vistas en el microscopio electrónico, las vesículas con cubiertas COPI no muestran las configuraciones poliédricas típicas de las vesículas de clatrina, sino que tienen aspecto algodonoso. El principal componente de la cubierta, COPI, es una proteína multimérica, formada por siete subunidades.

Las vesículas cubiertas de COPI intervienen en el transporte retrógrado desde el Golgi hacia el RE y entre las propias cisternas del complejo de Golgi, si bien su papel es objeto de controversia. Las primeras evidencias estaban a favor de que las cubiertas COPI se formaran, tanto en el RE, como en el Golgi. Sin embargo, no ha podido demostrarse, en investigaciones recientes, la formación de vesículas COPI en el RE, por lo que se supone que son vesículas retrógradas.

El ensamblaje está dirigido por ARF, que es una proteína G monomérica. ARF está presente en el citosol en forma de complejo ARF-GTP. Cuando ARF encuentra en la membrana que está a punto de dar origen a la vesícula, el *factor intercambiador de nucleótidos de guanina* apropiado, intercambia GDP por GTP. En esta configuración, ARF puede unirse a la membrana, insertando una región hidrófoba en la bicapa lipídica. Una vez anclada firmemente, recluta a los multímeros de COPI, y la cubierta así formada produce la gemación de una nueva vesícula. Cuando la vesícula se ha independizado, una proteína de membrana desencadena la hidrólisis de GTP y el ARF libera a las proteínas de la cubierta, que están listas para un nuevo ciclo.

Las vesículas cubiertas de COPII fueron descritas inicialmente en levaduras, donde intervienen en el transporte desde el RE al complejo de Golgi. Se han podido aislar, en células de mamíferos, algunos componentes homólogos a los del sistema COPII y, de hecho, parece que el mecanismo de exportación desde el RE al Golgi, mediado por COPII, está muy conservado entre levaduras y mamíferos. La cubierta COPII de levaduras se ensambla a partir de dos complejos proteicos —**Sec13/31** y **Sec23/24**— y una proteína G monomérica, similar a ARF y que se denomina **SarI**. Con un mecanismo parecido al de COPI, la molécula SarI con GDP unido se aproxima a la membrana que va a dar lugar a la vesícula. En ese momento, una proteína periférica de la membrana, intercambia GTP por GDP, facilitando que SarI se una a Sec13/31 y a Sec23/24. Posteriormente, cuando se haya formado la vesícula, uno de los componentes de la cubierta COPII induce la hidrólisis del GTP y SarI se separa de Sec13/31 y Sec23/24.

Las proteínas SNARE facilitan la fusión de las vesículas con las membranas de destino

La mayoría del tráfico intracelular mediado por vesículas cubiertas es muy específico. Como ya se ha señalado, el paso final de la clasificación de las proteínas sintetizadas en el RE, tiene lugar en la RTG, donde los lípidos y las proteínas se empaquetan en vesículas de transporte, con destinos diversos. Recordemos también que, en las vesículas de clatrina que parten de la RTG, los complejos adaptadores incluyen a las dos subunidades de adaptina. Son éstas las responsables, en parte, de la especificidad en el tipo de receptor que será incluido en la vesícula. Una vez formada la vesícula, se requieren proteínas adicionales, responsables de que llegue al destino apropiado. Esto puede ser muy complejo en una célula en la cual hay un intercambio constante de vesículas, de ida y vuelta, entre el RE y el aparato de Golgi, entre las cisternas de este último y entre el Golgi y la membrana plasmática. Debe existir, por tanto, un medio de prevenir que las vesículas en emigración se fusionen con membranas inadecuadas. La **hipótesis SNARE** se basa en un modelo de transporte intracelular, que satisface la importante etapa de clasificación y distribución (Figura 12.19).

De acuerdo con esta hipótesis, los componentes moleculares responsables de la clasificación y distribución de vesículas, en mamíferos, son dos familias de **proteínas SNARE** (**receptores de SNAP**): las **v-SNAREs** (**receptores SNAP de vesículas**), presentes en la vesícula y las **t-SNAREs** (**receptores SNAP de la membrana diana**), propios de la diana. Las v y t-SNAREs son proteínas complementarias, que junto con los factores de «amarre», permiten que una

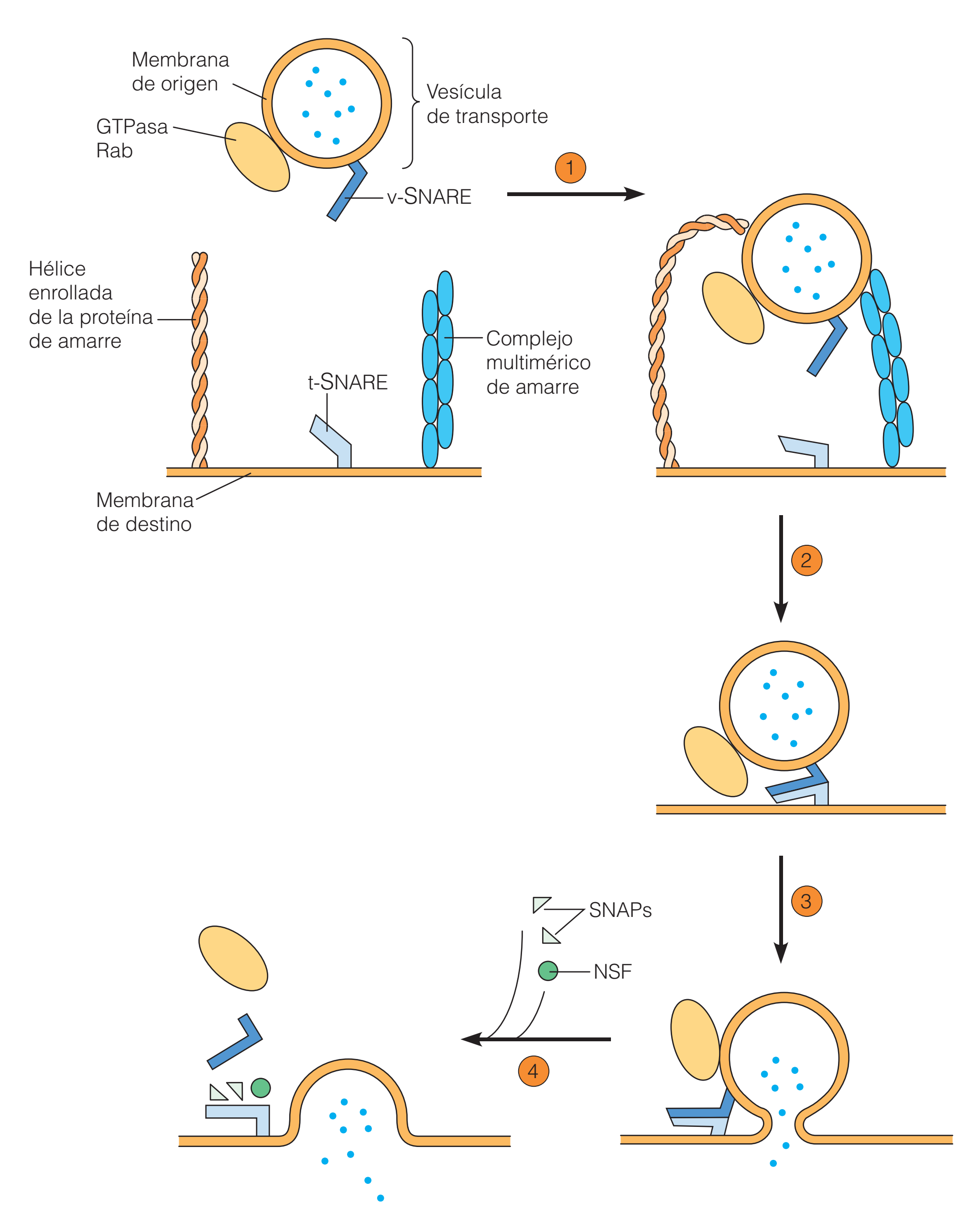


Figura 12.19 La hipótesis SNARE para el envío y fusión de las vesículas de transporte. Los componentes moleculares básicos que intervienen en la clasificación y distribución de vesículas, en células eucariotas, son las proteínas de amarre, las v-SNAREs en la vesícula de transporte, las t-SNAREs en la membrana de destino, la GTPasa Rab, NSF y varias SNAPs. ① Las proteínas de amarre de la membrana de destino, una con estructura de hélice enrollada y la otra, un complejo multimérico, reconocen y se unen a la vesícula. ② La ATPasa Rab se une a la vesícula y estimula la formación de una hélice cuádruple formada por una hélice v-SNARE y tres hélices t-SNARE. (Las proteínas de amarre no se vuelven a mostrar.) ③ La fusión de la membrana de la vesícula con la membrana de destino está promovida por la interacción de la v-SNARE con la t-SNARE. ④ La unión de NSF y SNAPs, desencadena la disociación de los complejos SNARE. El momento preciso de la hidrólisis del GTP o ATP no se conoce aún, pero posiblemente ocurra después de la fusión.

vesícula encuentre a su diana. Ambas fueron descubiertas durante el estudio de la exocitosis neuronal. Después de su descubrimiento en el sistema nervioso, se han encontrado también en levaduras y otros organismos.

Cuando la vesícula alcanza su destino, interviene una tercera familia de proteínas, las **GTPasas Rab**. Éstas son también específicas y cada tipo de destino lleva asociada una colección particular de proteínas Rab. Como se aprecia en la Figura 12.19, las SNAREs complementarias v y t forman una hélice estable de cuatro hebras. Esto asegura que, una vez han colisionado, permanecen en contacto el tiempo preciso para que la proteína Rab asociada a la vesícula afiance de forma estable a las v-SNARE con las t-SNAREs.

Después de la fusión de las vesículas, una nueva colección de proteínas, entre las que están el factor sensible a **N-etilmaleimida** (**NSF**) y las **SNAPs** (**proteínas de**

unión a NSF soluble), posibilitan la liberación de las v y t-SNAREs de vesícula y destino, posiblemente acompañada de hidrólisis de ATP. El hecho de que NSF y las SNAPs estén implicadas en la fusión de membranas muy diversas, hace pensar que ellas no son las responsables de la selectividad.

En estudios recientes se ha llegado a la conclusión de que las proteínas SNARE solas no son las únicas responsables de la especificidad. Se precisan otras, conocidas como proteínas de amarre, que actúan a larga distancia y proveen de una especificidad temprana, anterior a la interacción entre v-SNARE y t-SNARE (Figura 12.19). Así, se ha visto que la fragmentación de proteínas SNARE por ciertas toxinas in vivo, puede bloquear la formación del complejo SNARE, sin que se vea afectada la asociación entre vesícula y membrana. Incluso, en sistemas reconstituidos in vitro, las vesículas derivadas del RE se pueden unir a las membranas del Golgi, sin adición de proteínas SNARE.

En la actualidad se conocen dos tipos principales de proteínas de amarre —proteínas superenrolladas y complejos multiméricos—. Las proteínas superenrolladas, como las *golginas*, son importantes en el reconocimiento inicial y unión al complejo de Golgi, de las vesículas COPI y COPII. Las golginas se anclan por un extremo a la membrana del Golgi y con el otro contactan con las vesículas en paso. Además, intervienen también en la conexión entre las cisternas del complejo de Golgi. Los anticuerpos contra ciertas golginas, que son capaces de bloquear su función, producen la desorganización de la estructura de las cisternas mediales del Golgi.

La segunda categoría de proteínas de amarre está integrada por varias familias de proteínas multiméricas, cada una de ellas de cuatro a ocho, o incluso más, polipéptidos. Por ejemplo, el complejo *exoquiste* de levaduras y mamíferos, interviene en la secreción proteica, uniéndose a la membrana plasmática y a las vesículas de la RTG, destinadas a la exportación. Otros ejemplos de esta categoría de proteínas son los complejos *GOG* (*proteína oligomérica conservada del Golgi*), *GARP* (*proteína retrógrada asociada al Golgi*) y *TRAPP* (*partícula de transporte de proteínas*). Todos ellos están implicados en el reconocimiento temprano y especificidad de las interacciones entre la vesícula y la membrana de destino. La mayoría de los complejos están bastante conservados entre organismos tan alejados como las levaduras y el hombre. La asignación de funciones a cada complejo y, dentro de éstos, a cada subunidad, es uno de los campos más intrigantes de la Biología Celular actual.

Los lisosomas y la digestión celular

Los lisosomas son orgánulos que contienen las enzimas digestivas capaces de degradar las principales macromoléculas biológicas, incluyendo a los lípidos, los hidratos de carbono, los ácidos nucleicos y las proteínas. Las enzimas digestivas son necesarias para degradar el material extracelular que la célula ha tomado por exocitosis y para digerir estructuras intracelulares o macromoléculas dañadas o innecesarias. Analizaremos primero el órganulo y luego consideraremos los procesos digestivos, así como las enfermedades resultantes del mal funcionamiento de los lisosomas.

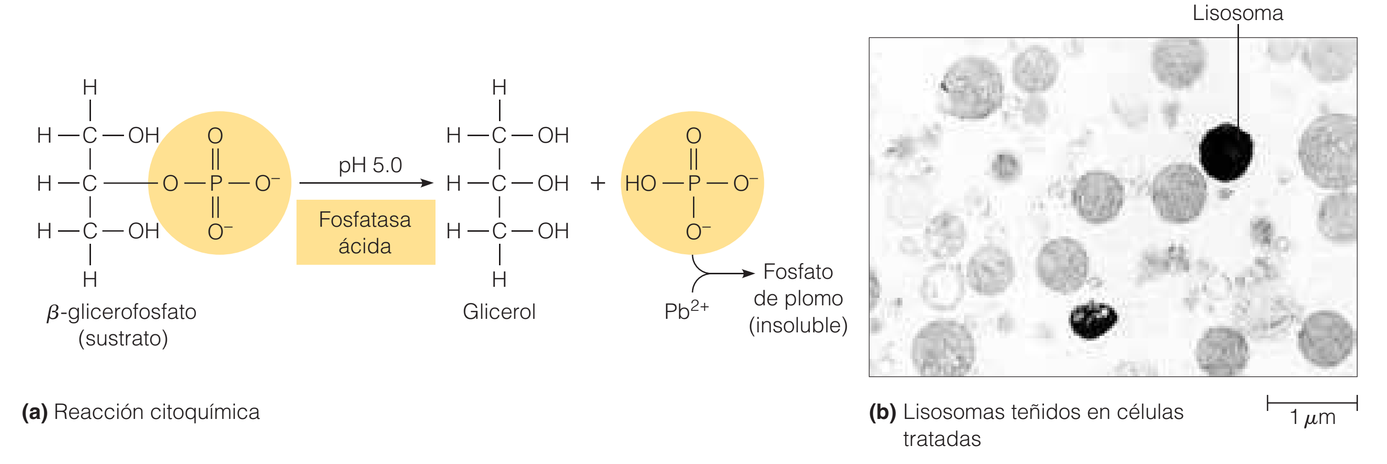
Los lisosomas aíslan a las enzimas digestivas, del resto de la célula

Como vimos en el Capítulo 4, los lisosomas fueron descubiertos por Christian de Duve y sus colaboradores, a principios de los años 50 (*véase* Anexo 4B). La centrifugación diferencial permitió a los investigadores darse cuenta de que la actividad fosfatasa ácida, inicialmente adscrita a las mitocondrias, estaba asociada a un tipo de partículas, que no había sido descrita anteriormente. Además de la fosfatasa ácisa, el nuevo orgánulo contenía otras encimas hidrolíticas, como la β-glucoronidasa, una desoxirribonucleasa, una ribonucleasa y una proteasa. Dado el aparente papel en la lisis celular, de Duve llamó a este orgánulo, *lisosoma*.

Sólo después de que la existencia del lisosoma hubiera sido predicha, descritas sus propiedades y especificada su dotación enzimática, se pudo observar en el microscopio electrónico, determinando que era un orgánulo característico de la mayoría de las células animales. La confirmación final vino de la mano de las tinciones histoquímicas, capaces de localizar la actividad fosfatasa ácida y otras enzimas lisosomales, en estructuras específicas, que habían sido vistas en el microscopio electrónico (Figura 12.20).

Los lisosomas varían sustancialmente en forma y tamaño, pero suelen encontrarse en torno a los 0,5 μm de diámetro. Como el RE y el aparato de Golgi, está rodeado de una membrana. Ésta es crucial para proteger al resto de la célula de las enzimas hidrolíticas, presentes en su interior. El lado luninal de la membrana lisosomal está altamente glicosilado, formando una cubierta casi continua, que la protege de las proteasas. El ambiente ácido (pH 4,0-5,0), que favorece la digestión de macromoléculas, se mantiene gracias a bombas de protones dependientes de ATP. Los productos de la digestión se transportan —bien activa, bien pasivamente— a través de la membrana, hacia el citosol, donde entran en las rutas catabólicas o son exportados de la célula.

La nómina de las enzimas lisosomales ha crecido considerablemente desde el trabajo original de de Duve, pero todas tienen en común el que son *hidrolasas ácidas*—enzimas con un pH óptimo en torno a 5,0—. La lista incluye como mínimo, 5 fosfatasas, 14 proteasas y peptidasas, 2 nucleasas, 6 lipasas, 13 glicosidasas y 7 sulfatasas. En conjunto, pueden digerir a la mayoría de las moléculas biológicas. No sorprende, por tanto, que permanezcan aisladas del resto de la célula, en la que causarían estragos.



(a) Reacción citoquímica

(b) Lisosomas teñidos en células tratadas

Figura 12.20 Localización citoquímica de la enzima lisosomal fosfatasa ácida. (**a**) Cortes finos de tejido fijado con glutaraldehído e incubado en un medio con β-glicerofosfato (sustrato de la fosfatasa ácida) y una sal de plomo soluble (generalmente nitrato de plomo). La fosfatasa ácida hidroliza al β-glicerofosfato, liberando glicerol y anión fosfato. Estos últimos reaccionan con los iones de plomo, formando fosfato de plomo, que precipita en el lugar de la actividad enzimática. (**b**) La microscopía electrónica revela la localización de la fosfatasa ácida en la célula. Los orgánulos teñidos de oscuro, que se muestran aquí, son lisosomas, destacados por la presencia de depósitos electrodensos de fosfato de plomo. Los orgánulos más claros son mitocondrias (TEM).

Los lisosomas se forman a partir de los endosomas

Las enzimas lisosomales se sintetizan en los ribosomas del RE rugoso, a cuya luz se incorporan, para ser transportadas hacia el complejo de Golgi. Tras las modificaciones en el RE y los compartimientos del complejo de Golgi, por algunas de las mismas enzimas que procesan las proteínas de secreción y las de membrana, las enzimas lisosomales se separan de otras proteínas, en la RTG. Anteriormente se ha descrito, en este mismo capítulo, la adición de una etiqueta manosa-6-fosfato a las enzimas solubles de los lisosomas. Hay también señales características para las proteínas de la membrana del lisosoma. Las enzimas se empaquetan en vesículas cubiertas de clatrina, que se forman en la RTG, pierden sus cubiertas y viajan hacia alguno de los compartimientos del endosoma (Figura 12.9).

La mayoría de las enzimas lisosomales son enviadas desde la RTG a un endosoma tardío. Recordemos que los endosomas tempranos se forman por la coalescencia de vesículas de la RTG y la membrana plasmática. Con el tiempo, el endosoma temprano madura y se transforma en un endosoma tardío, orgánulo que tiene una dotación completa de hidrolasas ácidas, pero que no está realizando ninguna función digestiva. Durante este lapso, las bombas de protones dependientes de ATP, bajan el pH de la luz del endosoma temprano de 6,0 a 5,5 y el orgánulo pierde su capacidad para unirse a más vesículas. El endosoma tardío es, en esencia, una colección de enzimas digestivas recién sintetizadas, así como de sustancias extra e intracelulares, destinadas a la digestión y empaquetadas de manera que la célula quede a salvo de las hidrolasas; finalmente, madura hacia lisosoma, o descarga su contenido en un lisosoma preexistente.

La etapa final en el desarrollo del lisosoma es la activación de las hidrolasas ácidas. Ésta pasa por desplazar a las enzimas y sus sustratos hacia un ambiente más ácido. Existen dos maneras de alcanzar este requerimiento. Las ATPasas de protones pueden rebajar el pH de la luz del endosoma tardío hasta 4,0-5,0, transformándose en lisosoma y generando, por tanto, un nuevo orgánulo. Alternativamente, el endosoma tardío puede transferir su contenido a la luz de un lisosoma ya existente. Hay, como mínimo, dos formas de transferencia desde el endosoma tardío al lisosoma. En el **modelo de fusión transitoria**, los endosomas tardíos se conectan transitoriamente con los lisosomas. Sólo se transfieren las nuevas proteínas y lípidos lisosomales, así como el material a digerir. Posteriormente, ambos orgánulos se disocian. En el **modelo híbrido**, el endosoma tardío y el lisosoma se fusionan para formar un orgánulo híbrido temporal, en el que las proteínas y lípidos de ambos, no están claramente segregados. Este paso va seguido de la clasificación y reciclado del componente endosómico hacia compartimientos más tempranos y de la digestión del material remanente.

Las enzimas lisosomales intervienen en varios procesos digestivos

Los lisosomas son necesarios para actividades celulares tan variadas como la nutrición, defensa, reciclado de componentes celulares y diferenciación. Podemos distinguir los procesos digestivos que dependen de las enzimas lisosomales, tanto por el lugar en el que son activas, como por el origen del material a digerir (Figura 12.21). Aunque la digestión es, casi siempre, intracelular, en algunos casos las enzimas lisosomales son segregadas por exocitosis. Por lo que respecta al origen de los materiales a digerir, cuando éstos provienen del exterior, se habla de **lisosomas heterofágicos**, mientras que si el material es de origen intracelular

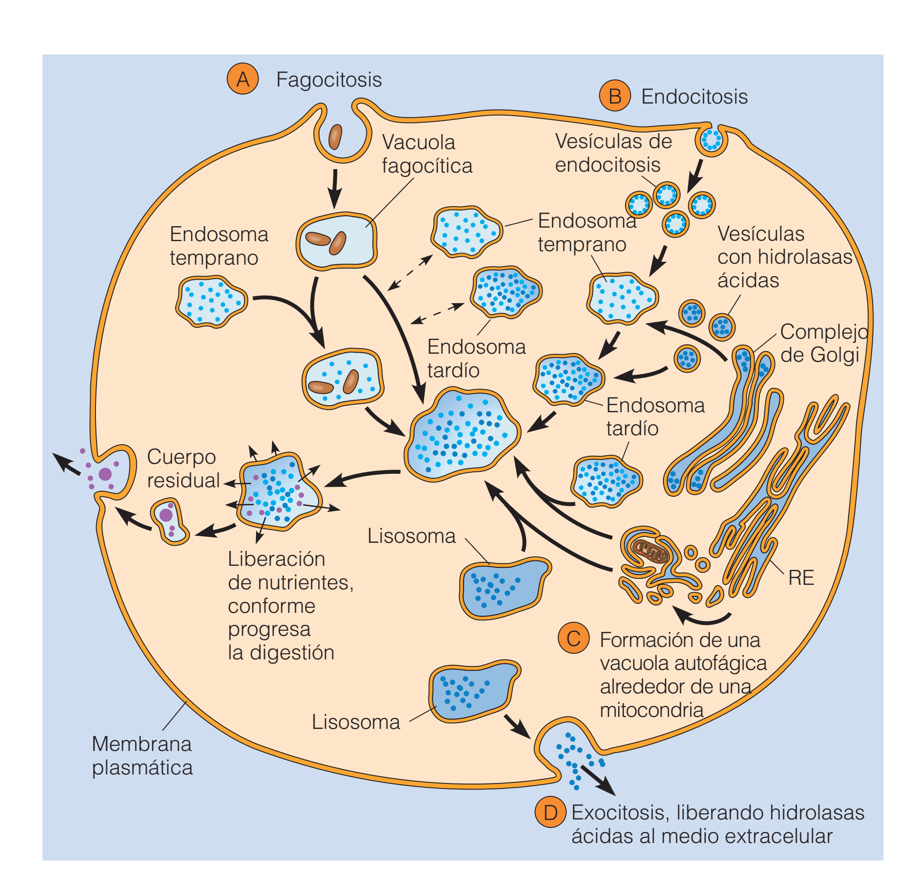


Figura 12.21 Formación de lisosomas y su papel en los procesos de digestión celular. En este esquema se muestran los principales procesos en los que participan los lisosomas. Las rutas mostradas son Ⓐ fagocitosis, Ⓑ endocitosis mediada por receptores, Ⓒ autofagia y Ⓓ digestión extracelular.

se denominan **lisosomas autofágicos**. Los procesos en los cuales intervienen las enzimas lisomales son: *fagocitosis*, *endocitosis mediada por receptores*, *autofagia* y *digestión extracelular*. Éstos se ilustran en la Figura 12.21, como rutas Ⓐ, Ⓑ, Ⓒ y Ⓓ, respectivamente.

Fagocitosis y endocitosis mediadas por receptores: papel de los lisosomas en la defensa y nutrición. Una de las principales funciones de las enzimas lisosomales es la degradación de los materiales extraños introducidos en la célula por *fagocitosis* y *endocitosis mediada por receptores* (Figuras 12.14 y 12.15). Las vacuolas fagocíticas se transforman en lisosomas por medio de, al menos, dos mecanismos (ruta Ⓐ de la Figura 12.21). Estas vesículas de endocitosis pueden, bien (1) acumular proteínas lisosomales, formando conexiones temporales con endosomas tempranos y tardíos, sin que la fusión sea permanente, o bien (2) se fusionan directamente con endosomas tempranos. Como consecuencia, los lisosomas generados por fagocitosis varían mucho en tamaño, apariencia, contenido del material digerible y etapa de la digestión. La mayoría de lo que ingiere una célula por endocitosis mediada por receptores, sigue una ruta sencilla. Las moléculas, una vez introducidas, son distribuidas por los endosomas más tempranos; el material a digerir permanece en los endosomas, a la vez que éstos van madurando para formar endosomas tardíos y lisosomas, hasta que entra en contacto con las hidrolasas ácidas (ruta Ⓑ de la Figura 21).

Los productos solubles de la ingestión, tales como azúcares, aminoácidos y nucleótidos, son exportados a través de la membrana del lisosoma hacia el citosol, donde son empleados como fuente de nutrientes. Algunos pasan por difusión facilitada, mientras que otros lo hacen por transporte activo. La acidez de la luz del lisosoma contribuye a generar un gradiente de protones a través de la membrana, que puede proveer de la energía necesaria para el transporte hacia y desde el citosol.

Al final de la digestión, sólo el material no digerible permanece en el lisosoma, que queda como un **cuerpo residual**. En los protozoos, los cuerpos residuales se fusionan con la membrana plasmática y expulsan su contenido por exocitosis, como se ilustra en la Figura 12.21. En los vertebrados, no existe tal mecanismo, por lo que los cuerpos residuales se acumulan en el citoplasma. Parece ser que la acumulación de restos contribuye al envejecimiento celular, especialmente en aquellas células longevas, como las del sistema nervioso.

Autofagia: el sistema original de reciclado. Una segunda e importante tarea de los lisosomas, es la destrucción de estructuras y componentes celulares que están dañados, o que ya no son necesarios. La mayoría de los orgánulos están sometidos a un flujo dinámico, donde los nuevos orgánulos recién sintetizados, reemplazan a los viejos, que son eliminados. Esta digestión de orgánulos u otras estructuras celulares, se conoce como **autofagia**, que en griego signifi-

ca «comerse a sí mismo». La autofagia se muestra como la ruta Ⓒ de la Figura 12.21.

Hay dos tipos de autofagia —*macrofagia* y *microfagia*—. La **macrofagia** se produce cuando un orgánulo u otra estructura son encerrados por una doble membrana derivada del RE. La vesícula resultante se denomina **vacuola autofágica** (o *autofagosoma*). A menudo es fácil identificar restos de estructuras celulares en dichas vacuolas, como se observa en la Figura 12.22. La **microfagia** supone la formación de una vacuola autofágica mucho menor, rodeada por una bicapa lipídica, que encierra pequeños fragmentos de citoplasma, más que orgánulos completos. El destino de una vacuola de autofagia es ligeramente distinto al de una vacuola fagocítica. En lugar de producirse una acumulación gradual de enzimas lisosomales, las vacuolas de autofagia tienden a fusionarse con endosomas tardíos o, directamente, con lisosomas activos.

La autofagia tiene lugar en la mayoría de las células, en muy diferentes condiciones y con diferentes tasas, siendo especialmente destacada en determinados momentos del desarrollo. Por ejemplo, durante la maduración de un eritrocito, se destruye prácticamente todo el contenido celular, afectando a todas las mitocondrias. Este proceso se verifica por digestión autofágica. También se observa un incremento notable en la autofagia, en células sometidas a ayuno. Posiblemente, la respuesta represente un intento desesperado por parte de la célula, para continuar obteniendo energía, a pesar de tener que consumir sus propias estructuras.

Digestión extracelular. La mayoría de los procesos de gestión en los que intervienen enzimas lisosomales, se verifican dentro de la célula, bien por endocitosis, o bien formando una vacuola autofágica. Sin embargo, en algunos casos, los lisosomas vierten sus enzimas por exocitosis hacia el medio extracelular, produciéndose la **digestión extracelular** (Figura 12.21, ruta Ⓓ). La digestión extracelular ocurre, por ejemplo, durante la fecundación de los oocitos de animales. La cabeza del espermatozoide libera enzimas lisosomales capaces de franquear las barreras químicas que, de otra manera, impiden que el espermatozoide penetre la superficie del huevo. Ciertas enfermedades inflamatorias, como la artritis reumatoide, pueden ser la consecuencia de una secreción anómala de enzimas lisosomales en las articulaciones, por parte de los leucocitos. En relación con esto, es interesante destacar que las hormonas esteroídicas, cortisona e hidrocortisona, son agentes antiinflamatorios eficaces, puesto que estabilizan las membranas lisosomales, inhibiendo así la liberación de enzimas.

Las enfermedades lisosomales de acumulación, suelen deberse a la retención de materiales no digeribles

El papel fundamental de los lisosomas en el reciclado de componentes celulares, se manifiesta claramente en las alteraciones causadas por deficiencias en determinadas proteínas lisosomales. Se conocen unas 40 **alteraciones de**

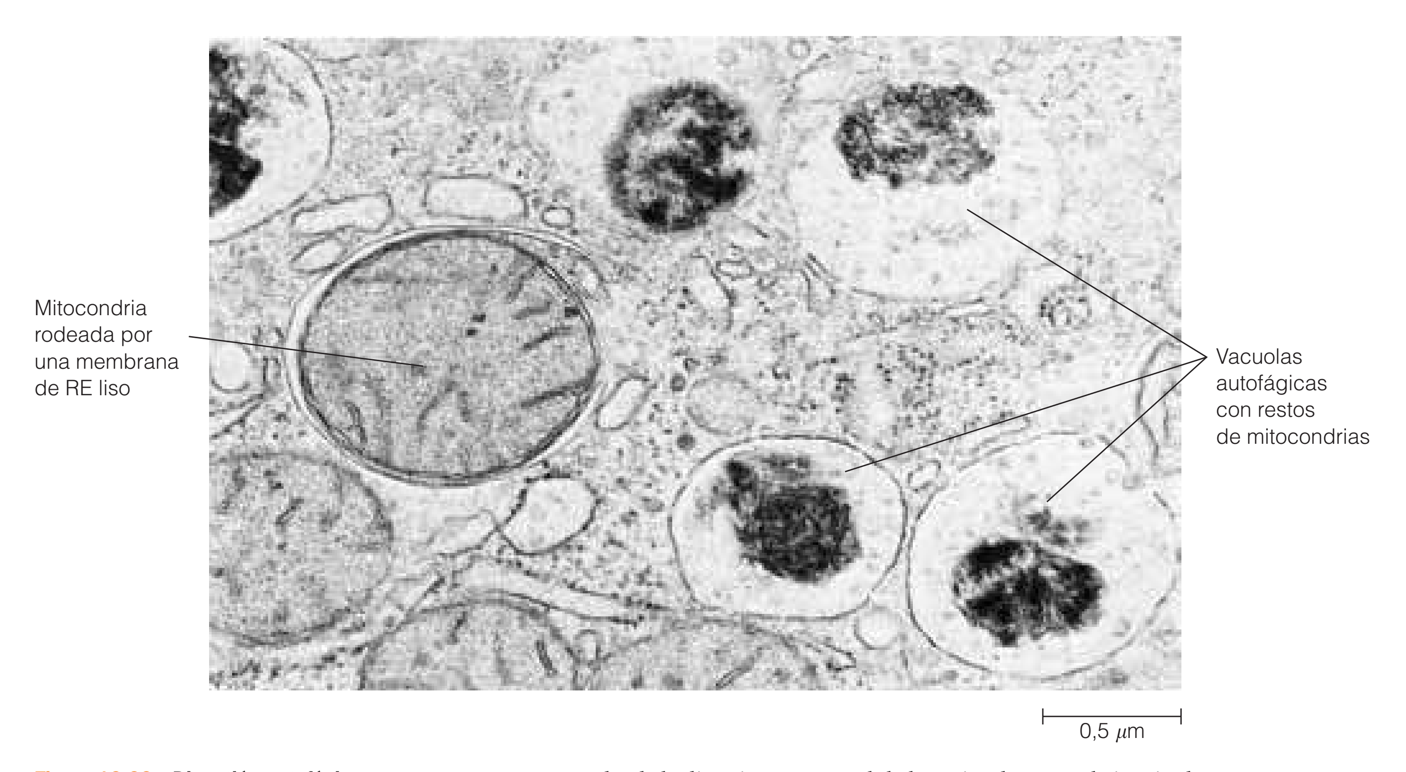


Figura 12.22 Digestión autofágica. Etapas temprana y tardía de la digestión en una célula hepática de rata. A la izquierda se ve una mitocondria rodeada por una membrana derivada del RE, en proceso de formación de una vacuola autofágica. A la derecha se observan varias vacuolas autofágicas, que contienen restos de mitocondrias (TEM). La digestión autofágica es la forma por la cual se eliminan la mayoría de los orgánulos viejos.

acumulación lisosomal, caracterizadas por la acumulación nociva de sustancias específicas, generalmente polisacáridos o lípidos (*véase* el Anexo 4A). En la mayoría de los casos, las sustancias se almacenan porque las enzimas digestivas faltan o son deficientes, pero a veces, la alteración se produce en las proteínas que transportan los productos de degradación, desde la luz del lisosoma hacia el citosol. En ambos casos, las células que acumulan el material sufren alteraciones graves e incluso se destruyen. El resultado suele consistir en deformaciones esqueléticas, atonía muscular y retraso mental, y frecuentemente son letales. Desgraciadamente, la mayoría de las enfermedades lisosomales de acumulación no son tratables.

La primera enfermedad de acumulación conocida, fue *la glucogenosis de tipo II*, caracterizada por la retención excesiva de glucógeno en el hígado, corazón y músculos esqueléticos de niños pequeños, que generalmente mueren a edad temprana. El problema tiene su origen en una forma deficiente de la enzima lisosomal α-1,4-glucosidasa, que cataliza la hidrólisis de glucógeno en células normales. El metabolismo del glucógeno tiene lugar, en su casi totalidad, en el citosol, pero una pequeña parte del polisacárido puede entrar en el lisosoma, por un mecanismo autofágico y si no se hidroliza a glucosa, se acumula hasta niveles peligrosos.

Dos de las patologías de acumulación lisosomal más conocidas son el *síndrome de Hurler* y el *síndrome de Hunter*. Ambas tienen su origen en deficiencias en la degradación de glicosaminoglicanos, que son el principal componente glucídico de los proteoglicanos de la matriz extracelular (*véase* el Capítulo 17). La enzima alterada en un paciente con el síndrome de Hurler es la *α-L-iuronidasa*, necesaria para la degradación de glicosaminoglicanos. La observación en el microscopio electrónico de las glándulas sudoríparas de un enfermo con este síndrome, revela la existencia de un elevado número de vacuolas atípicas, que se tiñen, tanto para fosfatasa ácida, como para glicosaminoglicanos. Aparentemente, las vacuolas son endosomas tardíos aberrantes, llenos de material no digerido.

El retraso mental es una característica común a muchas enfermedades de acumulación, porque afectan al metabolismo de glicolípidos, que son componentes esenciales de las células nerviosas y de las envueltas que rodean a los axones. Un ejemplo particularmente bien conocido, es la *enfermedad de Tay-Sachs*, alteración hereditaria de carácter recesivo. Los niños afectados sufren un deterioro mental rápido en torno al sexto mes de edad, seguido de parálisis y fallecimiento antes de los tres años. El origen está en la acumulación en el tejido nervioso de un gangliósido (un tipo de glicolípido). La enzima deficiente en este caso es la *β-N-acetil hexosaminidasa*, responsable del recorte de la N-acetil-galactosamina terminal del carbohidrato del gangliósido. Los lisosomas de los niños que padecen la enfermedad están llenos de fragmentos de membrana, que contienen los gangliósidos no digeridos.

Las vacuolas vegetales: orgánulos multifuncionales

Las células vegetales tienen compartimientos ácidos rodeados de membrana, denominados vacuolas, que recuerdan a los lisosomas encontrados en la mayoría de las células animales, pero que cubren, además, funciones adicionales. La biogénesis de las vacuolas es muy parecida a la de los lisosomas. La mayoría de sus componentes se sintetizan en el RE y son luego transferidos al complejo de Golgi, donde las proteínas terminan su maduración. Desde aquí parten vesículas cubiertas que contienen los lípidos y las proteínas destinados a las vacuolas, que forman una **provacuola**, análoga del endosoma. La provacuola madura y forma una vacuola funcional, que puede ocupar hasta el 90% del volumen de una célula vegetal.

Además de tener enzimas hidrolíticas, las vacuolas cumplen otras funciones esenciales para la viabilidad de las células vegetales. La mayoría de tales funciones están en relación con la imposibilidad de desplazamiento, que las hace muy susceptibles a los cambios que se producen en el medio. Como se mencionó en el Capítulo 4, una de las tareas esenciales de una vacuola, es el mantenimiento de la *presión de turgor*, la presión osmótica que hace que las células vegetales no se colapsen y que, en caso de necesidad, puedan expandirse. Durante el crecimiento, la reducción en la consistencia de la pared celular —acompañada de un aumento de la presión de turgor— permite que la célula se expanda. La dirección de la expansión se puede controlar de forma selectiva, haciendo que sean menos resistentes, ciertos segmentos de la pared celular. El mantenimiento del turgor está en relación directa con otras funciones de las vacuolas: la regulación de la concentración citoplásmica de varios solutos. Un ejemplo a destacar, es la regulación del pH del citosol. Las bombas de protones dependientes de ATP de la membrana de la vacuola, pueden compensar una bajada del pH del citosol (quizá debida a un cambio en el medio extracelular) bombeando protones desde el citosol hacia la luz de la vacuola.

La vacuola es también un lugar de almacenamiento. Las proteínas que almacenan las semillas suelen sintetizarse en ribosomas asociados al RE rugoso, incorporándose a la luz del retículo. Algunas de estas proteínas permanecen en el RE, mientras que otras se transfieren a las vacuolas, bien por autofagia de vesículas que parten del RE, bien por la ruta del Golgi. Cuando las semillas germinan, las proteínas de almacenamiento están prestas a ser hidrolizadas por las proteasas vacuolares, liberando aminoácidos que se emplearán en la síntesis de nuevas proteínas. Otros de los productos almacenados en las vacuolas son el malato, particularmente en los vegetales CAM (*véase* Capítulo 11), las antocianinas, responsables del color de las flores, que atraen a los insectos y aves polinizantes, sustancias tóxicas, que ahuyentan a posibles predadores, productos que protegen a las células de la luz ultravioleta y sustancias de desecho. El almacena-

miento de restos, solubles o insolubles, es una importante función de las vacuolas vegetales. A diferencia de lo que ocurre en las células animales, en las células vegetales no existen mecanismos de excreción de residuos solubles. Las inmensas vacuolas encontradas en las células vegetales, permiten a éstas acumular solutos hasta niveles que impedirían o restringirían los procesos metabólicos, si el material permaneciera libre en el citosol.

Los peroxisomas

Los peroxisomas, al igual que el complejo de Golgi y los lisosomas, son orgánulos rodeados por una membrana sencilla; pese a todo, no derivan del retículo endoplásmico y, por tanto, no son parte del sistema de endomembranas, que incluye a los otros orgánulos estudiados en este capítulo. Están presentes en todas las células eucarióticas, siendo especialmente abundantes en las células del riñón e hígado de mamíferos, en algas y células fosintéticas de vegetales y en semillas oleosas en germinación. Los peroxisomas, son ligeramente menores que las mitocondrias, si bien hay una considerable variación de tamaño, dependiendo del tejido en el que aparecen.

Prescindiendo de su localización o tamaño, la característica definitoria de un peroxisoma, es la presencia de *catalasa*, una enzima esencial para la degradación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Éste es un compuesto potencialmente tóxico, que se forma en diferentes reacciones de oxidación, catalizadas por *oxidasas*. Tanto la catalasa, como las oxidasas, quedan confinadas a los peroxisomas. Así pues, la generación y degradación del H_2O_2 ocurren en el mismo orgánulo, protegiendo a otras partes de la célula, a la exposición a este compuesto nocivo. Antes de discutir las funciones de los peroxisomas, veamos cómo fueron descubiertos y cómo pueden diferenciarse de otros orgánulos, cuando se observan en el microscopio electrónico.

El descubrimiento de los peroxisomas fue posible gracias a innovaciones metodológicas en la centrifugación en gradiente de densidad

Christian de Duve y sus colaboradores no sólo descubrieron los lisosomas, sino también los peroxisomas. En el curso de sus estudios iniciales con los lisosomas, determinaron, al menos una enzima, la *urato oxidasa*, que aparecía en la fracción lisosomal, pese a no ser una hidrolasa. Empleando un gradiente de concentración de sacarosa (Figura 12.7a), estos investigadores encontraron que la urato oxidasa del hígado de rata, se recuperaba en una región del gradiente, cuya densidad era ligeramente superior (1,25 g/cm^3) a la de otros orgánulos, tales como los lisosomas (alrededor de 1,20-1,24 g/cm^3) y mitocondrias (en torno a 1,19 g/cm^3).

Una vez que se pudo separar este nuevo orgánulo, se identificaron nuevas enzimas en la misma fracción que contenía la urato oxidasa, como la catalasa y la *D-aminoácido oxidasa*. Como ya hemos visto, la catalasa degrada el H_2O_2; al igual que la urato oxidasa, la de D-aminoácido oxidasa genera H_2O_2. Debido a su implicación en el metabolismo del peróxido de hidrógeno, el nuevo orgánulo recibió el nombre que *peroxisoma*. Desde entonces se han identificado nuevas enzimas características y en la actualidad se sabe que el complemento enzimático del orgánulo, varía considerablemente entre especies, órganos y, en algunos casos, incluso con el estado de desarrollo del órgano. En todo caso, la presencia de catalasa y una o más oxidasas, que generan peróxido de hidrógeno, constituyen la característica diferencial de todos los peroxisomas.

Después de haber sido identificados y aislados bioquímicamente, la existencia de los peroxisomas fue confirmada con el microscopio electrónico —primero en fracciones de peroxisomas aisladas a partir de gradientes de densidad y luego en células intactas—. Los peroxisomas resultaron ser los equivalentes funcionales de los orgánulos que habían sido observados previamente en micrografías electrónicas, tanto de células animales, como de células vegetales. Como su función era desconocida en aquel tiempo, fueron denominados simplemente como **microcuerpos**. En las células animales y vegetales, un microcuerpo mide aproximadamente de 0,2 a 2,0 μm de diámetro, está rodeado por una membrana simple y, en general, tiene una matriz (interior del orgánulo) de aspecto finamente granular.

Como se ve en la Figura 12.23, los peroxisomas animales suelen contener un núcleo cristalino, generalmente for-

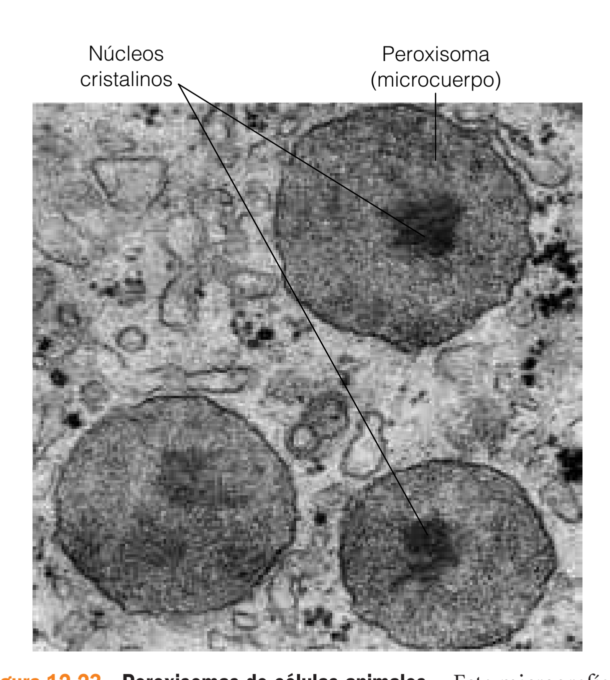


Figura 12.23 Peroxisomas de células animales. Esta micrografía electrónica muestra varios peroxisomas (microcuerpos) en el citoplasma de un hepatocito de rata. Los núcleos cristalinos son fácilmente observables. En los microcuerpos de células animales, el núcleo cristalino está constituido, casi siempre, por urato oxidasa (TEM).

mado por cristales de urato oxidasa. Los núcleos cristalinos son también característicos de los peroxisomas foliares (de hojas de plantas), si bien éstos están constituidos por la catalasa (*véase* Figura 4.20). Cuando están presentes dichos núcleos, es fácil identificar a los microcuerpos como peroxisomas, dado que la urato oxidasa y la catalasa son enzimas que definen a dichos orgánulos. En ausencia del cristal, no es siempre fácil el reconocimiento ultraestructural de los peroxisomas.

En tales casos es muy útil el empleo de una técnica citoquímica, conocida como *reacción de la diaminobencidina* (*DAB*). Este ensayo depende de la capacidad de la catalasa de oxidar a la DAB, formando un polímero que facilita la retención de átomos de osmio, densos a los electrones, cuando el tejido se trata con tetróxido de osmio (OsO_4). Los depósitos son fácilmente visibles en las células de los tejidos teñidos de esta manera. En los peroxisomas animales, la matriz suele teñirse intensamente con DAB, indicando que la catalasa es una enzima soluble, distribuida de forma homogénea. En las células de las hojas de vegetales, el tratamiento con DAB tiñe, preferentemente, los núcleos cristalinos de los peroxisomas (Figura 12.24), lo cual permite asegurar, que estos núcleos están formados, realmente, por cristales de catalasa. Como la catalasa es la única enzima presente en todos los peroxisomas y ausente en cualquier otro orgánulo, la reacción de la DAB es una forma segura de identificar a los peroxisomas.

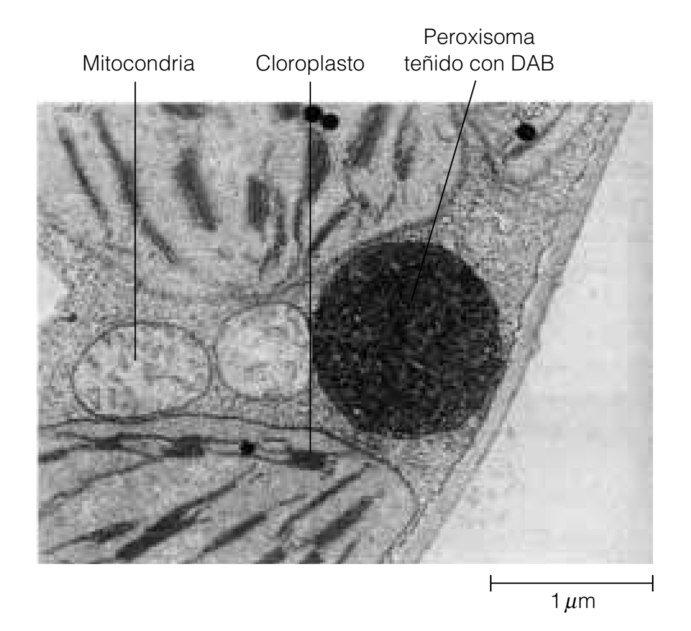


Figura 12.24 Localización citoquímica de la catalasa en peroxisomas vegetales. Imagen de una célula foliar de tabaco, similar a la mostrada en la Figura 4.20, pero teñida con diaminobencidina (DAB). La técnica de tinción es análoga al test citoquímico de la Figura 12.20. La catalasa oxida a la DAB que polimeriza y retiene átomos de osmio, densos a los electrones, cuando el tejido se trata con tetróxido de osmio (OsO_4). La técnica de la DAB demuestra que el depósito osmio queda confinado a los peroxisomas y, por tanto, la catalasa es un componente del núcleo cristalino (TEM).

La mayoría de las funciones de los peroxisomas están relacionadas con el metabolismo del peróxido de hidrógeno

Los peroxisomas están bien representados en animales, vegetales superiores, algas y algunos hongos. En los animales, son especialmente abundantes en el hígado y el riñón. Sus funciones han empezado a comprenderse recientemente, lo cual ha estimulado el estudio de las rutas metabólicas propias del peroxisoma y de las alteraciones que se producen cuando algunos de los intermediarios de éstas son deficientes. Se han descrito cinco funciones diferentes: metabolismo del peróxido hidrógeno, detoxificación de compuestos nocivos, oxidación de ácidos grasos, metabolismo de compuestos nitrogenados y catabolismo de sustancias infrecuentes.

Metabolismo del peróxido de hidrógeno. El papel más obvio de los peroxisomas de las células eucariotas es la detoxificación de H_2O_2, que se produce por la coexistencia en el mismo orgánulo de la catalasa y las oxidasas que generan H_2O_2. La especificidad de las oxidasas es variable, pero todas ellas tienen en común la capacidad de transferir electrones, directamente, desde sus respectivos sustratos, al oxígeno molecular (O_2), formando H_2O_2. Suponiendo que RH_2 es un sustrato oxidable, la reacción genérica catalizada por las oxidasas puede escribirse como

$$RH_2 + O_2 \longrightarrow R + H_2O_2 \qquad \textbf{(12.3)}$$

El peróxido de hidrógeno así formado se escinde por la catalasa, de dos maneras. Generalmente, la catalasa funciona en lo que se conoce como *modo catalítico*, en el que una molécula de H_2O_2 se oxida a oxígeno y una segunda se reduce a agua:

$$2H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2H_2O \qquad \textbf{(12.4)}$$

Dividiendo entre 2 a la Reacción 12.4 y conjugándola con la Reacción 12.3, se obtiene la reacción conjunta:

$$RH_2 + \tfrac{1}{2}O_2 \longrightarrow R + H_2O \qquad \textbf{(12.5)}$$

Alternativamente, la catalasa puede funcionar en *modo peroxidasa*, usando electrones derivados de un donador orgánico, para reducir el peróxido de hidrógeno a agua:

$$R'H_2 + H_2O_2 \longrightarrow R' + 2H_2O \qquad \textbf{(12.6)}$$

(La notación prima del grupo R indica que este sustrato puede ser diferente del de la Reacción 12.3). La correspondiente reacción conjunta es ahora:

$$RH_2 + R'H_2 + O_2 \longrightarrow R + R' + 2H_2O \qquad \textbf{(12.7)}$$

En cada caso, el resultado es el mismo: el peróxido de hidrógeno se degrada sin abandonar el peroxisoma. Dada la toxicidad de este compuesto (que es el principal componente activo de muchos desinfectantes), parece lógico que las enzimas responsables de su generación, aparezcan en el

mismo compartimiento que la catalasa, que cataliza su degradación. De hecho, la catalasa es la proteína más abundante en la mayoría de los peroxisomas, representando hasta el 15% del total proteico. Así, cualquier molécula de peróxido de hidrógeno generada por una oxidasa, encontrará una molécula de catalasa, lista para su degradación.

Degradación de compuestos nocivos. En su modo peroxidante (Reacción 12.6), la catalasa emplea diferentes sustancias como donantes de electrones, tales como el metanol, el etanol, el ácido fórmico, el formaldehído, nitritos y fenoles. Como todos estos compuestos son nocivos para las células, su detoxificación por la catalasa es una función vital de los peroxisomas. Posiblemente ésta es la causa de que los peroxisomas sean tan abundantes en el hígado y el riñón.

Oxidación de ácidos grasos. Los peroxisomas de las células animales y vegetales tienen las enzimas necesarias para oxidar los ácidos grasos. Este proceso, conocido como β-oxidación, también tiene lugar en las mitocondrias, como ya vimos en el Capítulo 10. Entre el 25 y el 50% de la oxidación de ácidos grasos en los tejidos animales, tiene lugar en los peroxisomas; el resto ocurre en las mitocondrias. Sin embargo, en las levaduras y las células vegetales, toda la β-oxidación se verifica en los peroxisomas.

En las células animales la β-oxidación en los peroxisomas parece ser especialmente importante para el catabolismo de los ácidos grasos de cadena larga (16-20 átomos de carbono), de cadena muy larga (24-26 carbonos) y de cadena ramificada. El producto primario, la acetil-CoA, se exporta al citosol donde se integrará en las rutas biosintéticas. Una vez que los ácidos grasos se han recortado hasta tener menos de 16 carbonos, el resto de la oxidación suele tener lugar en las mitocondrias. Esto quiere decir, que en los animales, los peroxisomas acortan los ácidos grasos, preparándolos para las subsiguientes etapas que se completarán en las mitocondrias, más que para hidrolizarlos por completo hasta acetil-CoA. En los vegetales y levaduras, la situación es distinta, y los peroxisomas llevan a cabo el catabolismo completo de ácidos grasos, rindiendo acetil-CoA.

Metabolismo de compuestos nitrogenados. Con la excepción de los primates, la mayoría de los animales necesita a la urato oxidasa (también llamada *uricasa*) para oxidar el urato, una purina que se forma durante el catabolismo de los ácidos nucleicos y de algunas proteínas. Como otras oxidasas, la urato oxidasa cataliza la transferencia directa de electrones desde el sustrato al oxígeno molecular, generando H_2O_2:

$$\text{Urato} + O_2 \longrightarrow \text{Alantoína} + H_2O_2 \qquad \textbf{(12.8)}$$

Como ya se ha comentado previamente, el H_2O_2 se degrada de inmediato en el peroxisoma, por la catalasa. La alantoína prosigue su metabolismo y se excreta, bien como ácido alantóico, o bien en forma de urea, en el caso de los crustáceos, peces y anfibios.

En el metabolismo de los compuestos nitrogenados están también implicadas una serie de enzimas conocidas como *aminotransferasas.* Entre ellas se encuentran las enzimas que catalizan la transferencia de grupos amino ($—NH_3$) desde los aminoácidos hasta los α-cetoácidos:

$$\underset{\text{Aminoácido}}{R{-}\overset{H_3N^+}{\overset{|}{C}}{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}O^-} + \underset{\alpha\text{-cetoácido}}{R'{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}O^-} \rightleftharpoons \underset{\alpha\text{-cetoácido}}{R{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}O^-} + \underset{\text{Aminoácido}}{R'{-}\overset{H_3N^+}{\overset{|}{C}}{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}O^-} \qquad \textbf{(12.9)}$$

Estas enzimas son esenciales en la biosíntesis y degradación de aminoácidos, transfiriendo los grupos amino de una molécula a otra.

Catabolismo de sustancias infrecuentes. Algunos de los sustratos de las oxidasas del peroxisoma, son compuestos raros, para los cuales la célula no ha desarrollado rutas de degradación. Entre estos compuestos se encuentran los D-aminoácidos, que no son reconocidos por las enzimas que degradan a los L-aminoácidos, propios de los polipéptidos. En algunos hongos, los peroxisomas están dotados de enzimas que degradan algunas sustancias infrecuentes denominadas **xenobióticos**, compuestos químicos ajenos a los organismos vivos. En esta categoría se incluyen los *alcanos*, hidrocarburos de cadena corta presentes en el petróleo y algunos de sus derivados. Los hongos capaces de metabolizar estos xenobióticos son utilizados para la descontaminación tras un vertido de petróleo.

Enfermedades asociadas a los peroxisomas. Considerando la variedad de rutas metabólicas que tienen lugar en los peroxisomas, no sorprende que un número elevado de patologías, tenga su origen en deficiencias de proteínas de estos orgánulos (*véase* el Anexo 4A). La alteración más frecuente es la *adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X*. La proteína deficiente responsable de esta enfermedad, es una proteína integral de membrana, posiblemente responsable de la entrada para su oxidación en el peroxisoma, de ácidos grasos de cadena larga. La acumulación de estos ácidos grasos desorganiza las envueltas de mielina del sistema nervioso.

Las células vegetales tienen peroxisomas especiales, no encontrados en las células animales

Los peroxisomas de plantas y algas están implicados en aspectos específicos del metabolismo energético, que ya discutimos en los Capítulos 10 y 11. Aquí sólo presentaremos a varios peroxisomas característicos de vegetales y consideraremos, brevemente, sus funciones.

Peroxisomas foliares. Las células de las hojas y otros tejidos fotosintéticos de vegetales, tienen grandes peroxisomas, denominados peroxisomas foliares, que aparecen frecuentemente próximos a cloroplastos y mitocondrias (*véanse* las Figuras 11.14 y 4.20). La proximidad espacial entre estos tres orgánulos, posiblemente refleja su implicación mutua en la *ruta del glicolato* (*véase* la Figura 11.15), también llamada *ruta fotorespiratoria*, pues en ella se produce la captura de O_2 y la liberación de CO_2, dependientes de la luz. Varias de las enzimas de esta ruta, entre las que se encuentran una oxidasa generadora de peróxido de hidrógeno y dos aminotransferasas, están confinadas en los peroxisomas foliares.

Glioxisomas. Otro tipo de peroxisoma vegetal, es el que aparece transitoriamente en semillas en germinación, que almacenan el carbono y la energía en forma de grasas (fundamentalmente triacilgliceroles). En estas especies, los triacilgliceroles almacenados, se movilizan y convierten en sacarosa, durante la etapa postgerminal temprana, en una secuencia de eventos, que incluye la oxidación de ácidos grasos y la ruta conocida como el *ciclo del glioxilato*. Todas las enzimas necesarias para estos procesos se localizan en unos peroxisomas especiales denominados **glioxisomas** (*véase* el Anexo 10A). Los glioxisomas se encuentran sólo en los tejidos capaces de almacenar grasas (según las especies, el endospermo o los cotiledones) y aparecen tan sólo durante el periodo de tiempo, relativamente corto, durante el cual, la semilla en germinación consume sus reservas lipídicas. Una vez completada esta función, los glioxisomas se convierten en peroxisomas. Los glioxisomas pueden reaparecer en tejidos senescentes de algunas plantas, posiblemente para degradar lípidos derivados de las membranas de las células envejecidas. Sin embargo, no está claro hasta qué punto son importantes en los procesos de envejecimiento celular.

Otros tipos de peroxisomas vegetales. Además de estar presentes en los tejidos que llevan a cabo la fotorespiración o la β-oxidación de ácidos grasos, los peroxisomas aparecen también en otros tejidos vegetales. Por ejemplo, los propios de los *nódulos*, estructuras de las raíces de ciertas plantas en las que se concentran bacterias, que facilitan la fijación del nitrógeno atmosférico (es decir, la conversión del N_2 en la forma orgánica). Los peroxisomas de estas células están implicados en el proceso de fijación del nitrógeno.

La biogénesis de los peroxisomas ocurre por división de peroxisomas preexistentes

Como otros orgánulos, los peroxisomas aumentan en número cuando la célula crece y se divide. La proliferación de orgánulos se conoce como *biogénesis* y las proteínas del peroxisoma que se requieren para este proceso, se denominan *peroxinas*. En el caso de los endosomas y lisosomas, la biogénesis se produce por fusión de vesículas que se forman en el complejo de Golgi. En su día se pensó que los peroxisomas se formaban de una manera similar. Posteriormente, muchos investigadores eran de la opinión de que su biogénesis sólo se producía por división de peroxisomas preexistentes, de manera similar a como lo hacen las mitocondrias y los cloroplastos. En la actualidad hay suficientes evidencias para pensar que los peroxisomas se pueden formar por cualquiera de estos dos procedimientos, e incluso por la combinación de ambos. En todo caso su biogénesis plantea dos cuestiones esenciales.

La primera, ¿de dónde provienen los lípidos necesarios para las membranas recién formadas? La respuesta es que una parte de los lípidos son sintetizados por enzimas del peroxisoma y el resto, especialmente la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina, viajan desde el RE. La mayoría de los lípidos son conducidos hacia los peroxisomas por los intercambiadores de fosfolípidos, ya mencionados con anterioridad. Sin embargo, hay alguna evidencia de que esas proteínas de intercambio puedan no ser lo suficientemente eficientes para la incorporación rápida de nuevos lípidos, por lo que se necesita la contribución de vesículas derivadas del RE.

La segunda, ¿dónde se sintetizan las enzimas y otras proteínas, tanto de la membrana, como de la matriz del peroxisoma? Las proteínas se sintetizan en ribosomas libres, no asociados al RE. Así pues, los péptidos completos se incorporan, después de su traducción, a los peroxisomas preexistentes. El paso de polipéptidos a través de la membrana del peroxisoma, es un proceso dependiente de ATP, mediado por peroxinas de la membrana, si bien el papel preciso del ATP es incierto.

La Figura 12.25 esquematiza la incorporación desde citosol de los componentes de la membrana y enzimas de la matriz, así como la formación de nuevos peroxisomas, por división de orgánulos preexistentes. La proteína representada en la figura es la catalasa, proteína tetramérica con un grupo hemo unido a cada una de sus subunidades. Las subunidades se sintetizan de forma individual en ribosomas de citosol, se importan por el peroxisoma y se pliegan y ensamblan junto con los grupos hemo, dando lugar a la enzima tetramérica activa. Se ha comprobado que los peroxisomas son capaces de importar no sólo los polipéptidos desplegados, sino también grandes polipéptidos plegados e incluso proteínas oligoméricas.

En recientes publicaciones se ha sugerido que algunas de las peroxinas se sintetizan en el citosol, pero se dirigen luego hacia el RE, antes de ser incorporadas en los peroxisomas. Como evidencia está la presencia, en ciertas peroxinas, de oligosacáridos en N, típicos en las proteínas sintetizadas en el RE. Por otra parte el tratamiento de levaduras con la toxina brefeldina A, que evita la formación de vesículas derivadas del RE, produce la acumulación en el retículo de la peroxina Pex3p. De forma análoga, en las células vegetales, la oxidasa del ascorbato parece dirigirse

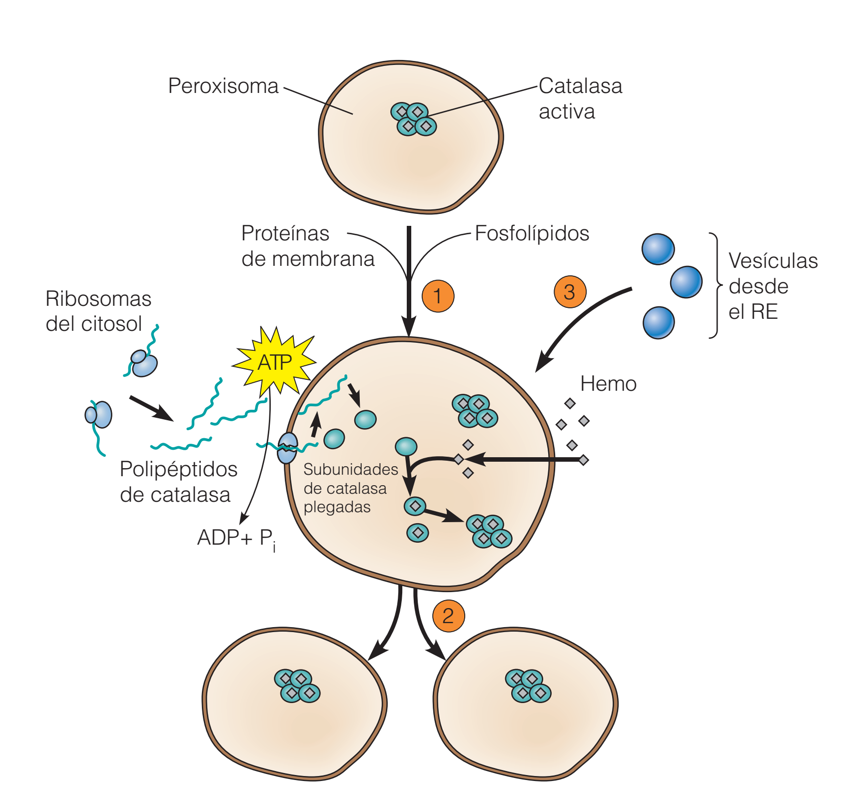


Figura 12.25 **Biogénesis de los peroxisomas.** Los peroxisomas se forman por división de peroxisomas preexistentes, en lugar de por fusión con vesículas provenientes del complejo de Golgi. ① Los lípidos, las proteínas de membrana y las enzimas de la matriz se añaden desde el citosol. La enzima que se muestra aquí es la proteína tetrámera catalasa. Los polipéptidos se sintetizan en ribosomas del citosol y sufren una traslocación post-traducción, a través de la membrana. El cofactor hemo entra por una vía independiente. Posteriormente, los polipéptidos se pliegan y ensamblan, para formar la proteína tetrámera activa. ② Después de la incorporación de lípidos y proteínas, los peroxisomas pueden dividirse, formando nuevos orgánulos. ③ Algunos autores creen que los peroxisomas pueden obtener las proteínas e incluso formarse de novo, a partir de vesículas derivadas del ER (protoperoxisomas).

hacia un subdominio del RE después de su síntesis en el citosol y antes de su incorporación en el peroxisoma. Este subdominio, presumiblemente implicado en la distribución de proteínas del citosol destinadas hacia los peroxisomas, ha sido denominado como el *retículo del peroxisoma* (pER), si bien su existencia es controvertida. De la misma manera también es debatida la existencia de los *protoperoxisomas*, vesículas derivadas del ER, que algunos investigadores suponen capaces de evolucionar hacia nuevos peroxisomas.

Para que pueda tener lugar la importación después de la traducción, las proteínas dirigidas a un orgánulo específico deben tener señales características que las dirijan. Estas señales son reconocidas por receptores apropiados u otras estructuras presentes en la superficie de la membrana. Las señales son segmentos de aminoácidos, que difieren por su secuencia, longitud y posición dentro de la proteína. Las señales típicas de, al menos algunas de las proteínas del peroxisoma, consisten en tan sólo tres aminoácidos, situados en o cerca del extremo carboxilo terminal. Una de las secuencias más habituales es la de serina-lisina-leucina (SKL), si bien son posibles ciertas variaciones en cualquiera de las tres posiciones.

Este tripéptido terminal, conocido como *PTS-1* (*señal-1 de destino al peroxisoma*) es reconocido por la peroxina del citosol Pex5p. Una segunda señal, situada en el extremo N-terminal y que recibe el nombre de *PTS-2*, interacciona con la peroxina Pex7p. Ambas peroxinas llevan a la proteína que porta las secuencias PTS hacia el peroxisoma, al cual es traslocada, por un mecanismo aún poco conocido. En la membrana del peroxisoma, Pex5p y Pex7p interaccionan con una o más proteínas de anclaje. Aparentemente, penetran en el peroxisoma llevando su carga, que liberan antes de ser exportadas al citosol, para participar en nuevos ciclos de transporte.

Suresh Subramani y otros científicos han demostrado que una proteína que normalmente se dirige al peroxisoma gracias a su etiqueta PTS-1, permanece en el citosol, si se elimina la secuencia SLK. En la misma línea, la adición de una secuencia SLK a una proteína de citosol, es suficiente para dirigirla hacia el peroxisoma. En suma, la secuencia SLK o sus posibles variantes, es *necesaria* y *suficiente* para dirigir proteínas hacia los peroxisomas. Es más, una secuencia propia de peroxisomas de una especie, a menudo funciona en otras especies, tan distantes como vegetales, levaduras, insectos y vertebrados. Por ejemplo, el gen de la *luciferasa*, una enzima del peroxisoma que permite emitir luz a las luciérnagas, se puede transferir a células vegetales, a partir de las cuales se hacen crecer plantas completas. Cuando las células de la planta genéricamente transformada se examinan cuidadosamente, se puede detectar la presencia de la luciferasa en los peroxisomas, los mismos orgánulos en los cuales se localiza en las luciérnagas. El conocimiento de los mecanismos de importación por el peroxisoma y la identificación de numerosas peroxinas conservadas desde levaduras hasta el hombre, en conjunción con los sofisticados métodos genéticos de los que se dispone en modelos de levaduras, permitirán conocer y tratar las enfermedades causadas por deficiencias en la biogénesis o importación de proteínas en los peroxisomas.

Perspectiva

El conocimiento de las células eucariotas pasa por la comprensión de sus membranas intracelulares y cómo éstas son las responsables de la compartimentación de funciones. El sistema de endomembranas está formado por una serie elaborada de orgánulos de membrana, que derivan directa o indirectamente del retículo endoplásmico (RE). El RE es una red de sáculos, túbulos y vesículas que separan a la luz del RE del citoplasma que lo rodea. El RE rugoso está salpicado de ribosomas y es el lugar de la síntesis de proteínas, cuyo destino es la incorporación a diferentes orgánulos —la envuelta nuclear, el complejo de Golgi, los endosomas y los lisosomas— o la secreción al exterior. Tanto el RE rugoso, como el liso, sintetizan lípidos para las membranas celulares; en el RE liso se verifican además otros muchos procesos, entre los que se incluye la detoxificación de drogas, el metabolismo de hidratos de carbono, el almacenamiento de calcio y la biosíntesis de esteroides. Una vez que las proteínas abandonan el RE en vesículas de transición, inician las primeras etapas de su modificación. Una serie de proteínas residentes del RE, cataliza la glicosilación y plegamiento de polipéptidos, la eliminación de proteínas mal plegadas y el ensamblaje de las proteínas multiméricas.

El complejo de Golgi desempeña un importante papel en la glicosilación y distribución de proteínas hacia otros orgánulos y la membrana plasmática. Las vesículas de transición que parten del RE, se fusionan con la red *cis*-Golgi, transfiriendo lípidos y proteínas hacia el complejo de Golgi. Las proteínas se van desplazando luego por los diferentes elementos del dictiosoma hasta alcanzar la red *trans*-Golgi. Durante este viaje, las proteínas sufren nuevas modificaciones, como los recortes y glicosilaciones en las cadenas laterales de oligosacáridos. Las vesículas de transporte formadas en la red *trans*-Golgi, llevan a las proteínas procesadas hasta sus destinos finales. Entre las proteínas procesadas por el aparato de Golgi, están aquellas que serán segregadas por exocitosis. Las vesículas y gránulos de secreción vacían su contenido en el medio extracelular, después de fusionarse con la membrana plasmática.

La exocitosis, que añade lípidos y proteínas a la membrana plasmática, se contrarresta con la endocitosis, que permite la ingestión de sustancias extracelulares, mediante la invaginación de la membrana celular. La endocitosis mediada por receptores es muy específica, pues depende de la interacción entre ligandos y receptores de la membrana. Los complejos receptor-ligando se concentran en las fosas cubiertas por clatrina. Una vez dentro de la célula, las vesículas pierden sus cubiertas proteicas y se fusionan con membranas intracelulares, generalmente las de los endosomas tempranos, que son los lugares donde se clasifica el material ingerido. Los receptores y los lípidos de membrana, a menudo se reciclan hacia la membrana plasmática, mientras que el material destinado a la degradación se mantiene en los endosomas, mientras éstos van madurando hacia endosomas tardíos y finalmente lisosomas.

Los endosomas tardíos son orgánulos que contienen hidrolasas ácidas inactivas. Las bombas de protones dependientes de ATP, presentes en la membrana, rebajan el pH de la luz del endosoma, transformando los endosomas tardíos en lisosomas. De forma alternativa, un endosoma tardío puede fusionarse con un lisosoma preexistente, al cual vierte su contenido. En ambos casos las hidrolasas ácidas latentes, capaces de degradar a la mayoría de las moléculas biológicas, se vuelven activas. Las vacuolas de fagocitosis adquieren las enzimas lisosomales fusionándose con los endosomas tempranos o estableciendo conexiones temporales con los endosomas. Las vacuolas de autofagocitosis suelen fusionarse con endosomas tardíos o lisosomas activos. La autofagia es necesaria para el reciclado de estructuras celulares dañadas o que ya no se precisan.

Las vesículas de transporte, llevan a los materiales a través del sistema de endomembranas. Las proteínas de las cubiertas —las que están la clatrina, COPI, COPII y caveolina— participan en la distribución de moléculas destinadas a diferentes lugares, y también en la formación de las vesículas. El conjunto de proteínas que cubren el exterior de una vesícula, determina el origen de la misma y su destino dentro de la célula. Cuando la vesícula alcanza su diana, es reconocida y unida por las proteínas de amarre de la membrana de destino. En ese momento, intervienen varias proteínas adicionales que catalizan la fusión de las membranas. Inmediatamente después, se produce la interacción entre dos familias de receptores proteicos complementarios, las v-SNARE y las t-SNARE. Una tercera familia de proteínas, las GTPasas Rab, dirigen la complementariedad de las v- y t-SNARES, justo antes de la fusión. Finalmente, el factor NSF y las proteínas SNAPs catalizan la disociación de las SNAREs, produciéndose la fusión de la membrana de la vesícula con la membrana de destino.

Los peroxisomas, que no son elementos propios del sistema de endomembranas, parecen proliferar por división de orgánulos preexistentes, más que por coalescencia de vesículas. Pese a todo, hay autores que defienden la existencia de los protoperoxisomas, vesículas que, partiendo del RE madurarían hasta formar nuevos peroxisomas. Algunos de los lípidos de la membrana del peroxisoma están sintetizados por enzimas del propio orgánulo; el resto son transportados desde el RE gracias a proteínas intercambiadoras de fosfolípidos. La mayoría de las proteínas del peroxisoma se sintetizan en ribosomas del citosol, siendo importadas una vez traducidas. Se piensa que otras maduran previamente en un supuesto subdominio del RE, conocido como el retículo peroxisómico (pER). La enzima que define a un peroxisoma es la catalasa. Ésta degrada el peróxido de hidrógeno, que es generado por varias oxidasas, antes de que este producto pueda malograr a los componentes celulares. En las células animales, las reacciones que ocurren en los peroxisomas son importantes para la detoxificación de sustancias nocivas, la oxidación de ácidos grasos y el metabolismo de compuestos nitrogenados. En los vegetales, los peroxisomas interviene en la conversión de lípidos de almacenamiento en hidratos de carbono (glioxisomas) y en la fotorespiración (peroxisomas foliares).

En este capítulo hemos considerado varias de las principales estructuras de membrana que se encuentran en las células eucariotas, incluyendo el RE, el complejo de Golgi, los endosomas, los lisosomas, las vesículas de exocitosis y endocitosis y los peroxisomas. En cada caso, hemos comprobado que cada estructura se caracteriza por la posesión de un juego propio de proteínas y por el desempeño de funciones específicas dentro de la célula. En la actualidad una de las preguntas más excitantes de la biología celular, concierne al tráfico de endomembranas: ¿cómo se las arreglan tantas proteínas y lípidos para alcanzar sus destinos característicos dentro de la célula y en el momento apropiado?

Problemas

Los problemas de mayor dificultad están marcados con un •.

12.1 Compartimentación de funciones. Cada uno de los siguientes procesos está asociado a uno más orgánulos de células eucariotas. Identifique en cada caso el orgánulo u orgánulos y sugiera una ventaja del confinamiento del proceso en el orgánulo en particular.

(a) β oxidación de ácidos grasos de cadena larga.

(b) Biosíntesis de cholesterol.

(c) Biosíntesis de insulina.

(d) Biosíntesis de testosterona (hormona sexual masculina).

(e) Degradación de orgánulos dañados o que ya no se necesitan.

(f) Glicosilación de proteínas de membrana.

(g) Hidroxilación de fenobarbital.

(h) Separación de las proteínas lisosomales y las de secreción.

12.2 Retículo endoplásmico. Señale cuáles de los siguientes supuestos son ciertos sólo para el RE rugoso (R), para el liso (L), para ambos (RL), o para ninguno (N).

(a) Contiene menos colesterol que la membrana plasmática.

(b) Tiene ribosomas adheridos a la superficie externa (citosólica).

(c) Está implicado en la detoxificación de drogas.

(d) Está implicado en la hidrólisis del glucógeno.

(e) Es el lugar donde se sintetizan las proteínas de secreción.

(f) Es el lugar donde se pliegan las proteínas de membrana.

(g) Tiende a formar estructuras tubulares.

(h) Generalmente está formado por sáculos aplanados.

(i) Es visible sólo con el microscopio electrónico.

12.3 Biosíntesis de las proteínas integrales de membrana. Además de su papel en la secreción celular, el RE rugoso y el complejo de Golgi, son responsables de la biosíntesis de las proteínas integrales de membrana. Más concretamente, esos orgánulos son la fuente de las glicoproteínas comúnmente encontradas en la monocapa externa de fosfolípidos de la membrana plasmática.

(a) Muestre esquemáticamente la síntesis y glicosilación de las glicoproteínas de la membrana plasmática.

(b) Explique por qué los grupos glucídicos de las glicoproteínas aparecen siempre hacia la cara externa de la membrana.

(c) ¿Qué ha asumido usted en relación con las membranas biológicas, para dibujar los esquemas del apartado a y responder a la cuestión del apartado b?

12.4 Vesículas cubiertas y transporte intracelular. Señale cuáles de los siguientes apartados son ciertos para vesículas cubiertas de clatrina, (C), COPI- (I), o COPII-coated (II). Cada uno puede ser cierto para una, varias, o ninguna (N) de las vesículas cubiertas estudiadas en este capítulo.

(a) La unión de la proteína de la cubierta a un receptor LDL está mediada por un complejo proteico adaptador.

(b) La fusión de la vesícula (después de la disociación de la cubierta) con la membrana del Golgi, está facilitada por una t-SNARE específica y por proteínas Rab.

(c) Interviene en el transporte bidireccional entre el RE y el complejo de Golgi.

(d) Interviene en la clasificación de proteínas para el transporte intracelular hacia destinos específicos.

(e) Interviene en el transporte de las hidrolasas ácidas hacia los endosomas tardíos.

(f) Es esencial en todos los procesos de endocitosis.

(g) Es importante en el tráfico retrógrado del aparato de Golgi.

(h) Está implicada en el transporte de lípidos de membrana desde la RTG hasta la membrana plasmática.

(i) El componente estructural básico de la cubierta es el triesqueleto.

(j) Las proteínas de la cubierta se disocian inmediatamente después de formarse la vesícula.

(k) Entre las proteínas de la cubierta siempre aparece una GTPasa monomérica.

12.5 Interpretando los datos. Cada uno de los siguientes enunciados resume los resultados de un experimento relacionado con la exocitosis o la endocitosis. Explique en cada caso la relevancia del experimento en relación con la comprensión de dichos procesos.

(a) La adición de colchicina a un cultivo de fibroblastos inhibe el movimiento de las vesículas de transporte.

(b) Algunas células de la hipófisis segregan laminina de forma continua y hormona adrenocorticotropa en respuesta a señales específicas.

(c) Células de las glándulas adrenales pueden segregar adrenalina en respuesta a una elevación experimental en la concentración de calcio intracelular.

(d) Las células que presentan una forma sensible a temperatura de la dinamina, se ven privadas de endocitosis mediada por receptores, cuando se produce una variación en la temperatura, si bien continúan con la ingesta de ruido extracelular (inicialmente a un nivel reducido y pasados unos 30-60 minutos, a niveles normales).

12.6 Digestión celular. Indique cuándo son correctos cada uno de los siguientes enunciados, con relación al proceso de digestión: fagocitosis (F), endocitosis mediada por receptores (R), autofagia (A), o digestión extracelular (E). En cada apartado puede haber una respuesta correcta, varias o ninguna (N).

(a) Puede implicar a la exocitosis.

(b) Puede producirse la fusión de vesículas o vacuolas con un lisosoma.

(c) El material digerido es de origen extracelular.

(d) El material digerido es de origen intracelular.

(e) Es esencial para la penetración del espermatozoide en el óvulo.

(f) Es importante en ciertas etapas del desarrollo.

(g) Intervienen hidrolasas ácidas.

(h) Se fusionan vesículas de endocitosis con endosomas tempranos.

(i) Se fusionan los lisosomas con la membrana plasmática.

(j) Tiene lugar en los lisosomas.

(k) Sirve como fuente de nutrientes para la célula.

12.7 Propiedades de los peroxisomas. Señale cuándo la respuesta es cierta para todos (T), algunos (A), o ninguno (N) de los varios tipos de peroxisomas descritos en este capítulo. Razone la respuesta.

(a) Reciben las proteínas del RE y del complejo de Golgi.

(b) Son capaces de catabolizar ácidos casos.

(c) Tienen hidrolasas ácidas.

(d) Tienen catalasa.

(e) En ellos se verifican reacciones químicas de generación de peróxido de hidrógeno.

(f) Tienen genes que codifican para la luciferasa.

(g) Tienen urato oxidasa.

(h) Son fuente de dolicol.

(i) Están rodeados por una bicapa lipídica.

12.8 Enfermedades lisosomales de acumulación. Pese a que la sintomatología es diversa, las enfermedades lisosomales de acumulación, tienen unas cuantas características comunes. En cada uno de los siguientes enunciados, indique si la característica es común a la mayoría de las enfermedades (M), si es cierta alguna alteración hizo sumar concreta (S), o si no es cierta en ninguno de los casos (N).

(a) El metabolismo deficiente de glicolípidos causa deterioro mental.

(b) Produce la acumulación de productos de degradación en el lisosoma.

(c) Produce la acumulación de excesiva cantidad de glucógeno en los lisosomas.

(d) Afecta a la capacidad de regular la síntesis de glicosaminoglicanos.

(e) Se origina por la ausencia de hidrolasas ácidas funcionales.

(f) Produce la acumulación de lisosomas en la célula.

(g) Entre los síntomas están la atonía muscular y el retraso mental.

(h) Desencadena la proliferación de orgánulos que contienen catalasa.

12.9 Distribución de proteínas. Para el transporte de proteínas hacia diferentes destinos intra y extracelulares, existen diferentes estrategias estructurales. En este capítulo han sido descritos tres ejemplos: (1) el péptido corto Lys-Asp-Glu-Leu, (2) los dominios hidrófobos transmembrana característicos, y (3) los residuos manosa-6-fosfato de cadenas laterales de oligosacáridos. Conteste a las siguientes preguntas para cada una de las estrategias referidas:

(a) ¿En qué parte de la célula se incorpora la señal en la proteína?

(b) ¿Cómo asegura la señal que la proteína vaya a su destino?

(c) ¿Hacia dónde se dirigiría la proteína si se le quitara la señal?

•**12.10 Silicosis y asbestosis**. La *silicosis* es una enfermedad debilitante de los mineros que se origina por la ingestión de partículas de sílice (como las de la arena o el vidrio) por los macrófagos pulmonares. La *Asbestosis* es una enfermedad también grave, causada por la ingesta de fibras de asbesto. En ambos casos, las partículas o fibras se encuentran en los lisosomas y se estimula a los fibroblastos para la formación de nódulos de fibras de colágeno en los pulmones, con la consecuente reducción de la capacidad pulmonar y alteración de la función respiratoria y causando finalmente la muerte.

(a) ¿Cómo cree que las fibras llegan a los lisosomas?

(b) ¿Qué efectos pueden producir en los lisosomas las partículas acumuladas?

(c) ¿Cómo se puede explicar la muerte de las células que contienen sílice o asbesto?

(d) ¿Qué cree que ocurre con las partículas de sílice y las fibras de asbesto cuando muere la célula? ¿Por qué siguen muriendo células indefinidamente, pese a que haya cesado la exposición al sílice o al asbesto?

(e) Los fibroblastos en cultivo siguen segregando colágeno y produciendo fibras conectivas tras la adición al cultivo del material proveniente de un cultivo de macrófagos pulmonares, que ha sido expuesto a partículas de sílice. ¿Qué indica esto al respecto de la deposición de nódulos de colágeno en los pulmones de los pacientes silicóticos?

•**12.11 Fraccionamiento Subcelular.** La Figura 12A.3 muestra un diagrama bidimensional de los coeficientes de sedimentación (en unidades Svedberg) y las densidades (en g/cm^3) en varios orgánulos, moléculas y virus. En cada caso, el área aproximadamente oval delimita el rango de los valores frecuentes de S y las densidades de una partícula dada. Básese en él y en la Figura 12A.3 y sus conocimientos de las técnicas de centrifugación descritas en el Anexo 12A, para contestar a las siguientes cuestiones:

(a) ¿Qué orgánulos o moléculas tienen los menores valores de S? ¿Y los mayores? ¿Las menores densidades? ¿Las mayores densidades?

(b) Compare la densidad de un ribosoma con las del RNA o una proteína. Considerando sus conocimientos acerca de los ribosomas, ¿cómo puede explicar su observación?

(c) Dado que la mayoría de los virus están formados por DNA o RNA unidos a proteínas, ¿por qué el coeficiente de sedimentación de un virus típico es mayor que el de las moléculas individuales de DNA RNA o proteína?

(d) ¿Se puede usar la centrifugación diferencial para separar los núcleos de las mitocondrias? ¿Por qué? ¿Se puede emplear esta técnica para separar los microsomas de las mitocondrias? ¿Por qué?

(e) ¿Se puede usar la técnica de la centrifugación en gradiente de densidad para separar microsomas de mitocondrias? ¿Por qué? ¿Se puede usar para la separación de RNA y DNA? ¿Por qué?

(f) Diseñe un esquema de purificación en el que se puedan separar, primero, lisosomas, peroxisomas y mitocondrias

de otros componentes obtenidos de un homogenado y luego separar la mezcla de los orgánulos en tres fracciones diferentes.

•**12.12 Enzimas y orgánulos.** La mayoría de los orgánulos se identifican y describen por las enzimas que presentan. Tanto los lisosomas, como los peroxisomas, fueron descubiertos por la presencia de enzimas cuya presencia no era fácil de explicar en estructuras ya conocidas.

(a) ¿Qué criterio emplearía para identificar de forma inequívoca un nuevo orgánulo, basado en las enzimas que contuviera?

(b) ¿Valdría este criterio para identificar lisosomas en una preparación de mitocondrias? Razone la respuesta.

(c) ¿Sería válido este criterio para identificar peroxisomas en una preparación de lisosomas? Razone la respuesta.

Bibliografía recomendada

Las referencias con importancia histórica están marcadas con •.

Citas generales

Lee, A. G., ed. *Biomembranes, Volume 1: General Principles.* Greenwich, CT: JAI, 1995.

Nunnari, J. y P. Walter. Regulation of organelle biogenesis. *Cell* 84 (1996): 389.

Retículo endoplásmico rugoso y complejo de Golgi

Ellgaard, L. y A. Helenius. ER quality control: Towards an understanding at the molecular level. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13 (2001): 431.

Glick, B. S. Organization of the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12 (2000): 450.

Helenius, A. y M. Aebi. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291 (2001): 2364.

Keller, P. y K. Simons. Post-Golgi biosynthetic trafficking. *J. Cell. Sci.* 110 (1997): 3001.

Klumperman, J. Transport between ER and Golgi. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12 (2000): 445.

Lippincott-Schwartz, J., T. H. Roberts y K. Hirschberg. Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16 (2000): 557.

Exocitosis y endocitosis

Blázquez, M. y K. I. J. Shennan. Basic mechanisms of secretion: Sorting into the regulated secretory pathway. *Biochem. Cell Biol.* 78 (2000): 181.

Lemmon, S. K. y L. M. Traub. Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12 (2000): 457.

Mostov, K. E., M. Verges y Y. Altschuler. Membrane traffic in polarized epithelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12 (2000): 483.

Mukherjee, S., R. N. Ghosh y F. R. Maxfield. Endocytosis. *Physiol. Rev.* 77 (1997): 759.

Pelham, H. R. B. Insights from yeast endosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14 (2002): 454.

Tjelle, T. E., T. Lùvdal y T. Berg. Phagosome dynamics and function. *BioEssays* 22 (2000): 255.

Vesículas de transporte

•Crowther, R. A. y B. M. F. Pearse. Assembly and packing of clathrin into coats. *J. Cell. Biol.* 91 (1981): 790.

Duman, J. G. y J. G. Forte. What is the role of SNARE proteins in membrane fusion? *Amer. J. Physiol.* 285 (2003): C 237.

Hinshaw, J. E. Dynamin and its role in membrane fission. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16 (2000): 483.

Kirchhausen, T. Clathrin. *Annu. Rev. Biochem.* 69 (2000): 699.

Schlegel, A. y M. P. Lisanti. Caveolae and their coat proteins, the caveolins: From electron microscopic novelty to biological launching pad. *J. Cell. Physiol.* 186 (2001): 329.

Storrie, B., R. Pepperkok y T. Nilsson. Breaking the COPI monopoly on Golgi recycling. *Trends Cell Biol.* 10 (2000): 385.

Whyte, J.R.C. y S. Munro. Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *J. Cell Sci.* 115 (2002): 2627.

Lisosomas y vacuolas

•Bainton, D. The discovery of lysosomes. *J. Cell. Biol.* 91 (1981): 66s.

Bonifacino, J.S. y L.M. Traub. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 72 (2003): 395.

De, D. N. *Plant Cell Vacuoles: An Introduction.* Collingwood, Victoria: CSIRO Publishing, 2000.

•de Duve, C. The lysosome. *Sci. Amer.* 208 (mayo de 1963): 64.

Klionsky, D.J. y S.D. Emr. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290 (2000): 1717.

Lloyd, J. B. y R. W. Mason, eds. *Subcellular Biochemistry, Volume 27: Biology of the Lysosome.* New York: Plenum, 1996.

Luzio, J. P., B. A. Rous, N. A. Bright, P. R. Pryor, B. M. Mullock y R. C. Piper. Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J. Cell. Sci.* 113 (2000): 1515.

Peroxisomas

Dammai, V. y S. Subramani. The human peroxisomal targeting signal receptor, Pex5p, is translocated into the peroxisomal matrix and recycled to the cytosol. *Cell* 105 (2001): 187.

•de Duve, C. The peroxisome: A new cytoplasmic organelle. *Proc. Roy. Soc. London Ser. B* 173 (1969): 71.

Gärtner, J. Organelle disease: peroxisomal disorders. *Eur. J. Pediatr.* 159 [Suppl 3] (2000): S236.

Lazarow, P. B., Peroxisome biogenesis: Advances and conundrums. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15 (2003): 489.

Mullen, R. T., C. R. Flynn y R. N. Trelease. How are peroxisomes formed? The role of the endoplasmic reticulum and peroxins. *Trends Plant Sci.* 6 (2001): 256.

Purdue, P. E. y P. B. Lazarow. Peroxisome biogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17 (2001): 701.

Reumann, S. The structural properties of plant peroxisomes and their metabolic significance. *Biol. Chem.* 381 (2000): 639.

Sacksteder, K. A. y S. J. Gould. The genetics of peroxisome biogenesis. *Annu. Rev. Genet.* 34 (2000): 623.

13

Mecanismos de transducción de señal: I. Señales eléctricas en células nerviosas

En el Capítulo 8 vimos que la capacidad de regular el flujo de iones entre el interior de la célula y el medio externo es una propiedad fundamental de las membranas celulares. Debido a que los iones son solutos cargados, las células pueden regular el flujo de corriente eléctrica así como el potencial eléctrico a través de sus membranas. El ejemplo más dramático de regulación de las propiedades eléctricas de las células es el funcionamiento del principal componente celular del sistema nervioso de los animales: la célula nerviosa, o *neurona.* Mediante el estudio de las neuronas, obtendremos conocimientos importantes sobre cómo regulan las células sus propiedades eléctricas y de cómo se pueden enviar señales entre ellas. De nuevo esto resalta un principio importante en la investigación biológica: las funciones celulares se pueden estudiar a menudo de manera óptima en células que están altamente especializadas para la función que nos interesa.

En este capítulo, examinaremos los mecanismos celulares que permiten actuar a las neuronas como el «cableado» del sistema nervioso mediante el cual pueden transmitir señales por todo el cuerpo a velocidades considerablemente elevadas, y las formas en que se conectan estos «cables» celulares entre ellos para formar circuitos. En la primera parte del capítulo, veremos que aunque virtualmente todas las células mantienen potenciales eléctricos a través de la membrana plasmática, las células nerviosas tienen mecanismos especiales para usar este potencial para transmitir información a través de largas distancias. En la segunda parte del capítulo, nos centraremos en los procesos mediante los cuales se transmite la información entre las células *remitentes* —neuronas o células sensoriales— y las *receptores* —otras células nerviosas, glándulas o células musculares—.

El sistema nervioso

Casi todos los animales tienen un **sistema nervioso**, en el cual se transmiten impulsos eléctricos a lo largo de las membranas plasmáticas de células nerviosas. El sistema nervioso desempeña tres funciones: *capta* información del medio («la luz se acaba de poner verde»), *procesa* esa información («verde significa adelante») y *elabora respuestas* frente a dicha información activando *efectores* específicos, habitualmente tejido muscular o glándulas («pisar el acelerador»).

Para llevar a cabo esas funciones, el sistema nervioso tiene componentes especiales para enviar y procesar información y para desencadenar las respuestas apropiadas (Figura 13.1). Introduciremos esos componentes en los vertebrados brevemente, y los discutiremos en más detalle a lo largo del capítulo. El sistema nervioso está dividido en dos componentes, el sistema venoso central y el sistema nervioso periférico. El *sistema nervioso central (CNS)* está constituido por el cerebro y la médula espinal, que incluyen tanto a células sensoriales como motoras; el *sistema nervioso periférico (PNS)* está formado por todos los otros componentes sensoriales y motores, incluyendo el sistema nervioso somático y el sistema nervioso autónomo. El *sistema nervioso somático* controla los movimientos voluntarios de la musculatura esquelética, mientras que el *sistema nervioso autónomo* controla las actividades involuntarias del músculo cardíaco, la musculatura lisa del tracto gastrointestinal y los vasos sanguíneos, y diversas glándulas secretoras.

Las células que componen el sistema nervioso se pueden dividir de forma general en dos grupos: neuronas y

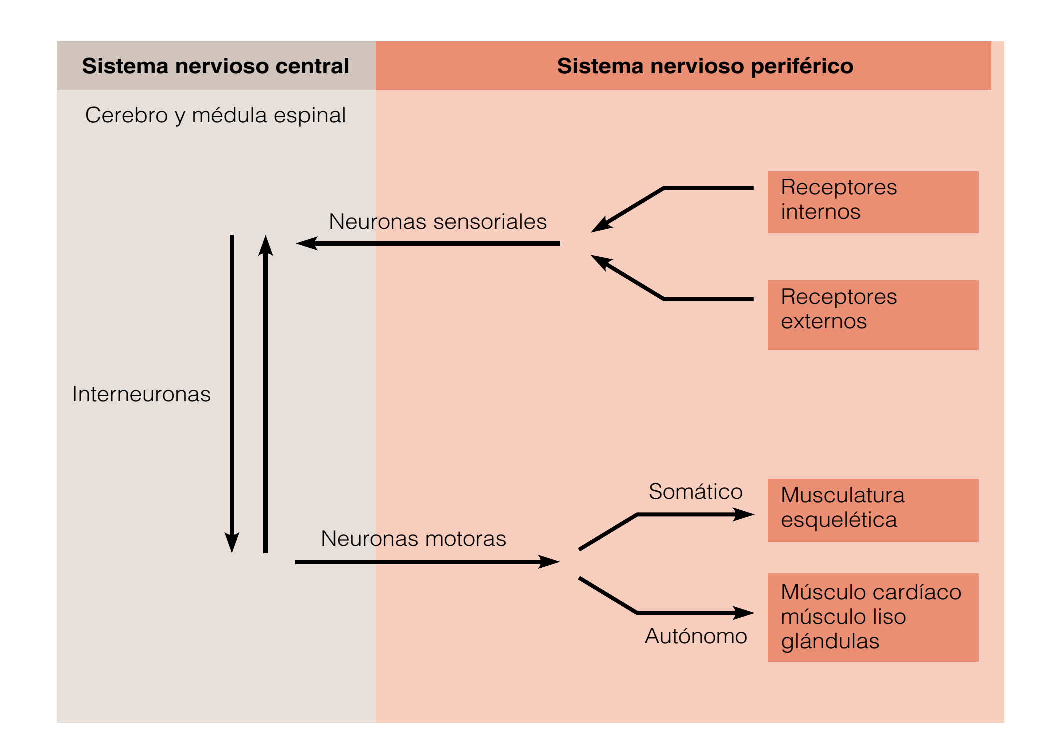


Figura 13.1 El sistema nervioso central en vertebrados. El sistema nervioso está formado por el sistema nervioso central (marrón) y del sistema nervioso periférico (naranja). Las neuronas sensoriales del sistema nervioso periférico reciben información procedente de receptores externos e internos y la transmiten al CNS. Las interneuronas en el CNS integran y coordinan la respuesta a esta información sensorial, siendo un buen ejemplo de esto las neuronas de la corteza cerebral. Las respuestas motoras se originan en el CNS y son transmitidas a la musculatura esquelética a través de neuronas del sistema nervioso somático y a los músculos involuntarios mediante el sistema nervioso autónomo.

células de glía. Todas las **neuronas** envían o reciben impulsos eléctricos. Las *neuronas* se puede subdividir en tres tipos básicos de acuerdo con su función: neuronas sensoriales, neuronas motoras e interneuronas. Las neuronas sensoriales son un grupo diverso de células especializadas en la detección de varios tipos de estímulos; proporcionan un flujo continuo de información al cerebro sobre el estado del cuerpo y del medio, a partir de varios receptores sensoriales. Los fotorreceptores de la retina (empleados en la visión), las neuronas olfativas (olfato) y las diversas neuronas sensibles al tacto, presión, dolor y temperatura localizadas en la piel y en las articulaciones son ejemplos de neuronas sensoriales. Las **neuronas motoras** transmiten señales desde el CNS hasta los músculos o las glándulas que inervan, es decir, hasta los tejidos a los que envían señales. Las interneuronas procesan señales recibidas de otras neuronas y envían información a otras regiones del sistema nervioso.

El término de célula glial (de *glia*, palabra griega «pegamento») engloba una variedad de tipos celulares diferentes —incluyendo microglía, oligodendrocitos, células de Schwann y astrocitos—. Las células de *microglía* son células fagocíticas que combaten infecciones y eliminan desechos. Los *oligodendrocitos y las células de Schwann* forman la *vaina de mielina* aislante alrededor de las neuronas del CNS y de los nervios periféricos, respectivamente. Los *astrocitos* controlan el acceso de los vasos sanguíneos al fluido extracelular que rodea a las células nerviosas formando la barrera hematoencefálica.

Los tejidos cerebrales complejos que son responsables de la coordinación de las funciones nerviosas están formados por redes complejas de neuronas —en humanos alrededor de 10 billones de células nerviosas—. Cada neurona puede recibir información de miles de otras neuronas, por lo que el número de conexiones del cerebro está en el rango de los trillones. A pesar de su aparente complejidad, los ordenadores ni siquiera se aproximan a este número de conexiones. Sin embargo, como los datos de un ordenador, la información neural consiste en *señales* o «bits» individuales. Nuestro propósito aquí es examinar los mecanismos celulares por los que se propagan estás señales eléctricas, denominadas *impulsos nerviosos,* más que discutir la función general de sistema nervioso. Además de comprender específicamente las funciones de las células nerviosas, adquiriremos una mejor apreciación de diversos aspectos generales de la función de las membranas, de las cuales, las células nerviosas representan un ejemplo de especialización muy desarrollado.

Las neuronas están específicamente adaptadas para la transmisión de señales eléctricas

En la Figura 13.2 se muestra la estructura de una neurona motora típica. El **cuerpo celular** de la mayoría de las neuronas es semejante al de otras células y está formado por un núcleo y la mayoría de los principales orgánulos. Las neuronas también tienen extensiones o ramas denominados *procesos*. Existen dos tipos de procesos: los que reciben señales y las combinan con señales recibidas de otras neuronas se denominan **dendritas**, y aquellos que emiten señales, en ocasiones a través de grandes distancias se denominan **axones**. El citoplasma dentro de un axón se de-

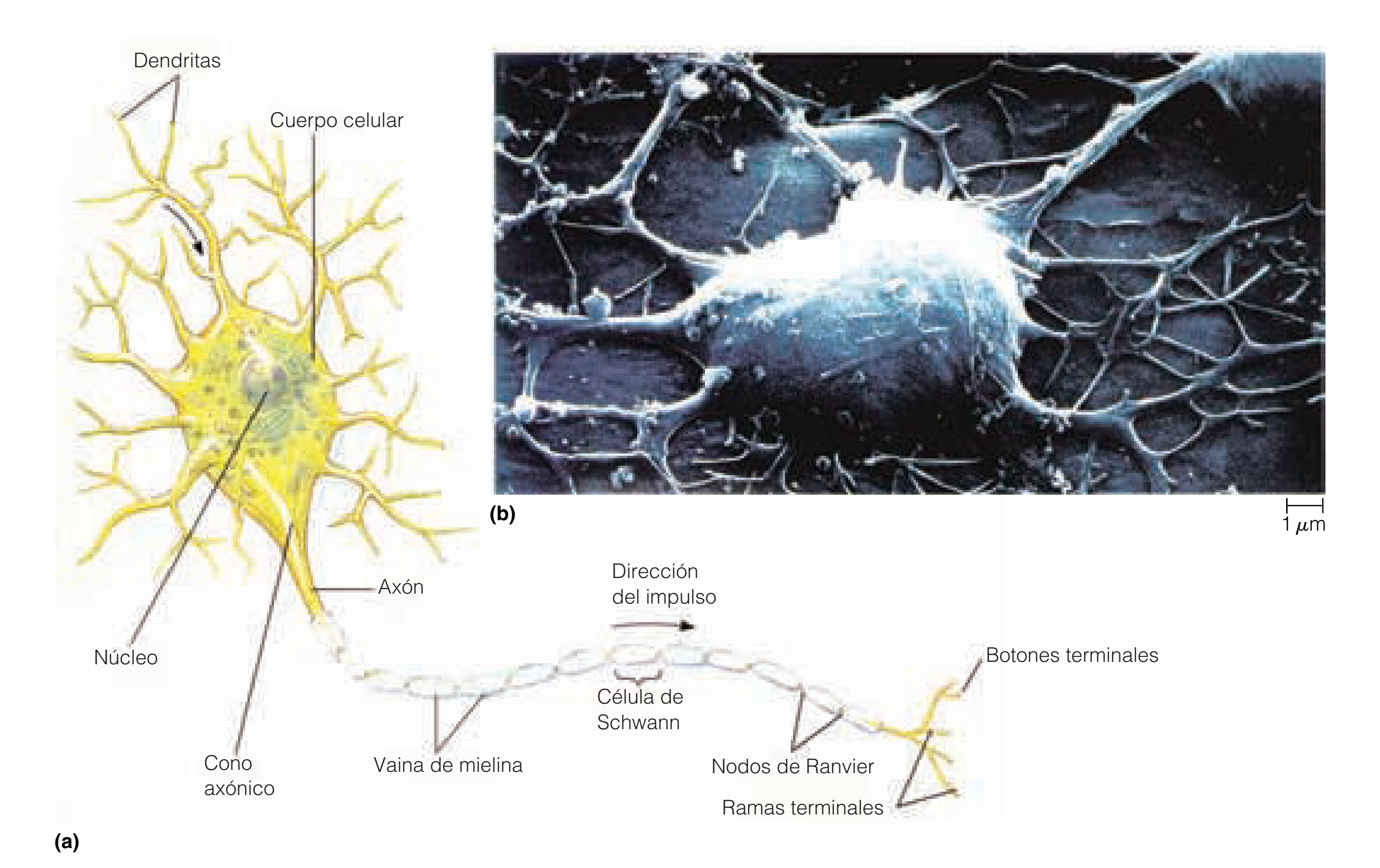


Figura 13.2 Estructura de una neurona motora típica. (**a**) diagrama de una típica neurona motora. El cuerpo celular contiene al núcleo y la mayoría de los orgánulos habituales. Las dendritas transmiten pasivamente las señales recibidas por la célula hacia el cuerpo celular; el axón transmite señales de salida, que se originan cerca del cono axónico (la dirección de la transmisión se indica mediante flechas negras). Al final del axón existen numerosos terminales axónicos. Algunas, pero no todas las neuronas, tienen una vaina de mielina discontinua alrededor de sus axones, para aislarlos eléctricamente. Cada segmento de esa vaina consiste en capas concéntricas de membrana enrolladas en torno al axón, que se originan en una célula de Schwann (o un oligodendrocito en el CNS). Las discontinuidades en la vaina de mielina, llamadas nodos de Ranvier, son regiones donde se concentra la actividad eléctrica. (**b**) Micrografía electrónica de barrido del cuerpo celular y las dendritas de una neurona motora. Las células de Schwann no son visibles.

nomina comúnmente **axoplasma**. La mayoría de los axones de vertebrados están rodeados por una **vaina de mielina**, que aísla segmentos del axón separados por *nodos de Ranvier*. Los axones pueden ser muy largos —hasta varios miles de veces más largos que el diámetro del cuerpo celular—. Por ejemplo, una neurona motora que inerva su pie, tiene el cuerpo celular en la médula espinal y su axón se extiende aproximadamente 1 m a lo largo de su pierna. Un **nervio** es simplemente un tejido compuesto por haces de axones.

Como ilustra la Figura 13.2, una neurona motora tiene múltiples dendritas ramificadas y un único axón saliendo de su cuerpo celular. El axón de una neurona típica es mucho más largo que las dendritas y forma múltiples ramas. Cada rama termina en estructuras denominadas *botones terminales*. Los botones terminales son responsables de la transmisión de la señal a la siguiente célula, que puede ser otra neurona, o una célula muscular o glandular. En todos los casos, la unión se denomina sinapsis. En las uniones neurona-neurona, las sinapsis se producen habitualmente entre un axón y una dendrita, pero se pueden producir entre dos dendritas. Las neuronas establecen generalmente sinapsis con muchas otras neuronas.

Las neuronas muestran una variabilidad estructural mayor que la que se sugiere en la Figura 13.2. Algunas neuronas sensoriales tienen un único proceso, que transmite señales tanto hacia el cuerpo celular como hacia fuera de él. Además, la estructura de los procesos no es aleatoria; muchas clases diferentes de neuronas en el sistema nervioso central se pueden identificar únicamente por su estructura (Figura 13.3).

Comprensión del potencial de membrana

Recuerde de los contenidos del Capítulo 8, que el **potencial de membrana** es una propiedad fundamental de todas

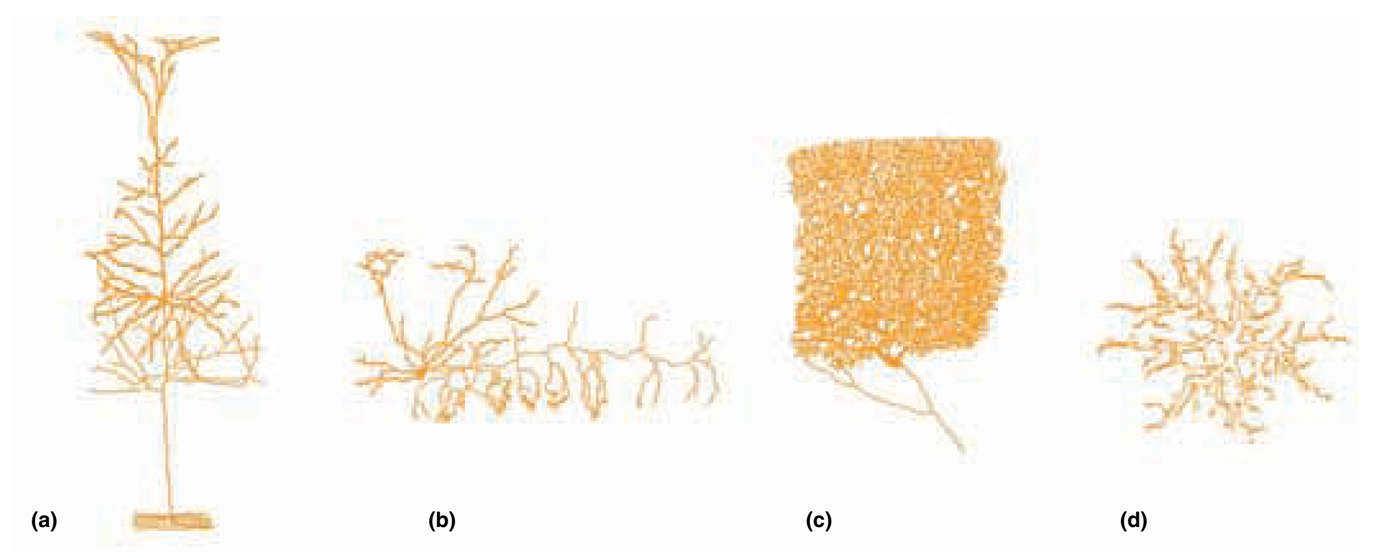


Figura 13.3 **Formas neuronales.** Las neuronas del sistema nervioso central tienen una amplia variedad de formas características. (**a**) Neurona piramidal de la corteza cerebral. (**b**) Numerosas células de axón corto de la corteza cerebral. (**c**) Célula de Purkinje del cerebelo. (**d**) Célula horizontal sin axón de la retina.

las células. Se produce por el exceso de carga negativa en un lado de la membrana plasmática y un exceso de carga positiva al otro lado. Las células en reposo normalmente tienen un exceso de carga negativa dentro y un exceso de carga positiva fuera de ellas; el potencial eléctrico resultante se denomina **potencial de membrana de reposo,** indicado como $\mathbf{V_m}$. El potencial de membrana se puede medir introduciendo un electrodo fino dentro de la célula y otro fuera de ella; su valor se expresa normalmente en milivoltios (mV). (No confunda el potencial V_m con la unidad mV.) Los electrodos comparan la proporción entre carga negativa y positiva dentro y fuera de la célula. Debido a que el interior de la célula tiene normalmente un exceso de carga negativa, decimos que las células tienen *en reposo un potencial de membrana negativo*. Por ejemplo, el potencial de reposo es de aproximadamente −60 mV en el axón gigante de calamar.

Las células nerviosas, musculares y otros tipos celulares como las células de los islotes de Langerhans del páncreas de vertebrados exhiben una propiedad especial denominada **excitabilidad eléctrica**. En las células excitables eléctricamente ciertos tipos de estímulos desencadenan una rápida secuencia de cambios en el potencial de membrana conocidos como *potencial de acción*. Durante un potencial de acción, el potencial de membrana varía de valores negativos a positivos, y posteriormente, otra vez a valores negativos, y todo esto en poco más de 1 milisegundo. El potencial de acción en las nerviosas tiene la función específica de transmitir señales eléctricas a lo largo del axón. Para comprender cómo usan las células nerviosas los potenciales de acción para transmitir señales, debemos primero examinar cómo se genera en las células el potencial de reposo de la membrana y cómo cambia el potencial de membrana durante un potencial de acción.

El potencial de membrana en reposo depende de las concentraciones diferenciales de iones dentro y fuera de la neurona

El potencial de membrana en reposo se produce porque el citoplasma de la célula y el fluido extracelular tienen composiciones diferentes de cationes y aniones. El fluido extracelular es una solución acuosa de sales, que incluye cloruro sódico y una menor proporción de cloruro potásico. El citoplasma contiene potasio y no sodio como catión principal, debido a la acción de la bomba Na^+/K^+ (descrita en el Capítulo 8). Los aniones del citoplasma están formados por macromoléculas como proteínas, RNA y otras moléculas diversas que no están presentes en el exterior de la célula. Estas macromoléculas cargadas negativamente no pueden pasar a través de la membrana plasmática, y por lo tanto, permanecen dentro de la célula. En la Tabla 13.1 se muestran las concentraciones de iones importantes para dos tipos de neuronas bien estudiadas, el axón de calamar y un tipo de axón de mamíferos.

Para comprender cómo se genera el potencial de membrana necesitamos recordar algunos principios físicos básicos. En primer lugar todas las sustancias tienden a difun-

Tabla 13.1 **Concentraciones iónicas dentro y fuera de axones y neuronas**

	Axón de calamar		Neurona de mamífero (neurona motora de gato)	
Ion	Exterior (mM)	Interior (mM)	Exterior (mM)	Interior (mM)
Na^+	440	50	145	10
K^+	20	400	5	140
Cl^-	560	50	125	10

dir desde la zona donde están más concentradas a zonas de menor concentración. Las células normalmente tienen en su interior una concentración alta de iones potasio y una concentración baja de potasio fuera de la célula. Nos referiremos a esta distribución asimétrica de potasio como el *gradiente de iones potasio*. Por convención, el gradiente de iones potasio se expresa como la concentración molar de iones potasio fuera de la célula ($[K^+]_{ext}$) dividido por la concentración molar de potasio en el citoplasma ($[K^+]_{int}$), —esto es $[K^+]_{ext}/([K^+]_{int}$. Debido al alto gradiente de concentración de potasio, los iones potasio tienden a difundir fuera de la célula.

El segundo principio básico es la *electroneutralidad*. Cuando los iones están en una solución siempre se presentan como pares, un ion positivo por cada ion negativo, de forma que no existe un desequilibrio neto de carga. Para un tipo concreto de ion que denominaremos A, debe existir en la solución un ion B con carga opuesta, por lo que nos referiremos a B como el *contraión* de A. En el citoplasma, los iones potasio (K^+) sirven como contraiones para los aniones atrapados. Fuera de las células, los iones sodio (Na^+) son el principal catión y el cloro (Cl^-) es su contraión.

Aunque una solución debe tener en general un número equivalente de cargas positivas y negativas, estas carreras pueden estar separadas localmente de forma que una región puede tener más cargas positivas mientras que otra región puede tener más cargas negativas. La separación de cargas requiere energía; y consecuentemente, una vez que se han separado, tienden a atraerse de nuevo. La tendencia de los iones con carga opuesta a atraerse se denomina **potencial** o **voltaje**. Cuando los iones positivos o negativos se están moviendo, uno hacia el otro, decimos que fluye **corriente**; y esta corriente se mide en amperios (A). Una vez establecidos estos principios, podemos comprender ahora cómo se forma el potencial de membrana en reposo, como resultado de las composiciones iónicas del citosol y del fluido extracelular y de las características de la membrana plasmática.

La membrana plasmática es normalmente permeable a los iones potasio debido a las fugas que se producen a través de algunos tipos de canales de potasio, que permiten la difusión de potasio hacia fuera de la célula. Sin embargo, no existen canales para macromoléculas con carga negativa. A medida que el potasio abandona el citosol, se quedan atrás un número cada vez mayor de aniones atrapados sin contraiones. Por lo tanto, se acumula en el citosol un exceso de carga negativa y fuera de la célula un exceso de carga positiva, que tiene como resultado la generación del potencial de membrana.

La Figura 13.4 ilustra la formación del potencial de membrana en un contenedor dividido en dos compartimentos por una membrana semipermeable. El compartimiento de la izquierda representa el citosol de una célula y el de la derecha el fluido extracelular. La membrana semipermeable es permeable a iones potasio pero no a las

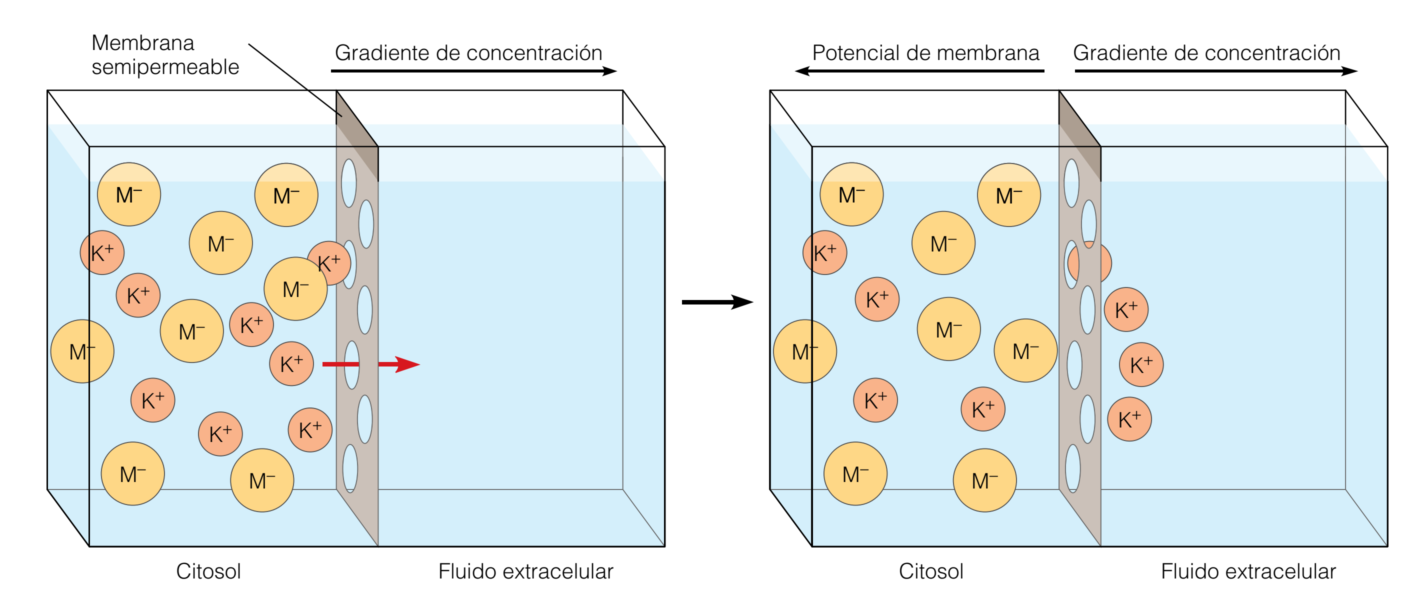


Figura 13.4 **Desarrollo del potencial de equilibrio de la membrana.** Se emplea un contenedor de dos compartimentos separados por una membrana semipermeable para representar al citosol de una célula y al espacio extracelular. En cada contenedor, el compartimiento de la izquierda representa al citosol y el de la derecha al fluido extracelular. El citosol contiene una alta concentración de iones potasio (K^+) y aniones impermeables (M^-) con relación a su concentración en el fluido extracelular. A medida que los iones potasio difunden hacia fuera de la célula (de izquierda a derecha), los aniones impermeables permanecen retenidos, creando un potencial de membrana. La magnitud del potencial de membrana se incrementa hasta que se alcanza un equilibrio en el que en la atracción eléctrica de los aniones por los iones potasio evita la difusión neta de iones potasio hacia el exterior de la célula. En este punto el potencial de membrana está en equilibrio con el gradiente de los iones potasio.

macromoléculas con carga negativa (representadas como M^-). El compartimiento citosólico contiene una mezcla de iones potasio y macromoléculas con carga negativa. Para simplificar, asumiremos que el compartimiento extracelular tiene inicialmente sólo agua. Como resultado del gradiente de concentración, los iones potasio difunden a través de la membrana de izquierda a derecha. Sin embargo, las macromoléculas con carga negativa no pueden seguirlos. Se crea un potencial de membrana por la separación de la carga positiva y negativa. El origen de la energía (definida como fuerza × distancia), necesaria para producir esta separación de carga, radica en el gradiente de iones potasio.

A medida que los iones potasio difunden de izquierda a derecha en la Figura 13.4, el compartimiento de la izquierda se hace negativo progresivamente. Este potencial se produce hasta un punto en el que los iones potasio cargados positivamente vuelven al compartimiento de la izquierda tan rápidamente como lo abandona. De esta forma se alcanza un equilibrio en el que la fuerza de atracción, debido al potencial de membrana, neutraliza la tendencia del potasio a difundir a favor de su gradiente de concentración. Este tipo de equilibrio, en el que el gradiente químico se equilibra con un potencial eléctrico, se denomina **equilibrio electroquímico.** El potencial de membrana en el punto de equilibrio se conoce como **potencial de membrana de equilibrio o potencial equilibrio**; la magnitud del gradiente de iones potasio determina la magnitud del potencial de equilibrio. En la siguiente sección presentaremos una descripción matemática de esta relación que nos permite estimar el potencial de membrana.

La ecuación de Nerst describe la relación entre potencial de membrana y la concentración iónica

La ecuación de Nerst, que recibe su nombre en honor del físico-químico alemán y Premio Nobel Walter Nerst, que la formuló a finales de la década de 1880 en el contexto de su trabajo con células electroquímicas (precursores de las baterías modernas). La ecuación describe la relación matemática entre el gradiente y iónico y el potencial de equilibrio de membrana que se forma cuando la membrana es permeable únicamente a ese ion:

$$E_X = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X]_{ext}}{[X]_{int}} \qquad \textbf{(13.1)}$$

Aquí, E_X es el potencial equilibrio para el ion X (en voltios), R es la constante de los gases (1,987 cal/V-mol), $[X]_{ext}$ es la concentración de X fuera de la célula (en *M*) y $[X]_{int}$ es la concentración de X dentro de la célula (en *M*). Esta ecuación puede simplificarse si asumimos que la temperatura es 293 °K (20 °C) (un valor apropiado para el axón gigante de calamar) y que X es un catión monovalente y por lo tanto tiene una valencia de +1. Si sustituimos estos valores por *R, T, F*, y *z* en la ecuación de Nerst y convertimos los logaritmos naturales a $\log_{10}$ ($\log_{10} = \ln/2{,}303$), la Ecuación 13.1 se simplifica a

$$E_X = 0{,}058 \log_{10} \frac{[X]_{ext}}{[X]_{int}} \qquad \textbf{(13.2)}$$

En esta forma simplificada podemos observar cómo por cada 10 veces que se incremente el gradiente de cationes, el potencial de membrana cambia −0,058 V o −58 mV.

Los iones retenidos dentro de la célula tienen efectos importantes sobre el potencial de reposo

Aunque la Figura 13.4 explica la formación del potencial de membrana, es incompleta principalmente porque no tiene en cuenta los efectos de los aniones. La membrana celular es relativamente permeable a algunos aniones, pero impermeable a otros. El principal anión en el fluido extracelular es el cloro, que se mueve con relativa libertad a través de las membranas. Además del cloro, la célula contiene aniones impermeables (M^-) y para mantener la neutralidad eléctrica debe también contener un número equivalente de cationes. Podemos expresar esta idea matemáticamente como

$$[C^+]_{int} = [M^-]_{int} + [A^-]_{int} \qquad \textbf{(13.3)}$$

donde C^+ y A^- representan cationes y aniones difusibles con un número equivalente de cationes. La neutralidad eléctrica se alcanza cuando

$$[C^+]_{ext} = [A^-]_{ext} \qquad \textbf{(13.4)}$$

Si incrementamos las concentraciones de solutos en la célula, encontraremos que hay más sustancias disueltas dentro de la célula. Por lo tanto, tenderá a entrar agua en el citosol, provocando que la célula se hinche. Si este proceso continúa sin control, la célula terminará estallando.

Para prevenir el hinchamiento y la ruptura es necesario un soluto impermeable fuera de la célula para equilibrar la osmolaridad del citosol. La concentración elevada de iones sodio, presente en el fluido extracelular, satisface este requerimiento debido a la escasa permeabilidad de la membrana a los iones sodio. Además, cuando los iones sodio se filtran a través de la membrana son extraídos del citosol por una ATPasa conocida como la bomba Na^+/K^+.

La bomba Na^+/K^+. Aunque la membrana plasmática es relativamente impermeable a los iones sodio siempre se producen pequeñas fugas. Si el Na^+ continuase entrando en la célula, finalmente la célula se hincharía y estallaría. Para compensar esta fuga, la bomba Na^+/K^+ bombea sodio hacia afuera de la célula mientras que transporta potasio hacia el interior (*véase* Figura 8.12). Como media, la bomba transporta tres iones sodio hacia el exterior de la célula y

dos potasios hacia el interior, por cada molécula de ATP que hidroliza. Este transporte neto de iones hacia el exterior de la célula diluye al citosol y por lo tanto previene el hinchamiento. Además, la bomba Na^+/K^+ mantiene el gradiente de potasio a través de la membrana lo que proporciona la base para el potencial de reposo.

Las concentraciones estacionarias de los iones comunes afectan al potencial de reposo de la membrana

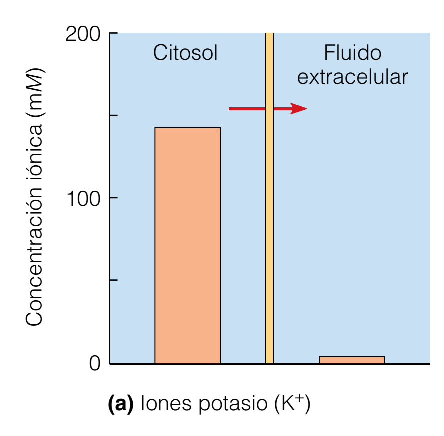
Como hemos visto, los iones sodio, potasio y cloro son los principales componentes iónicos presentes tanto en el citosol como en el fluido extracelular. Debido a su distribución asimétrica a través de la membrana celular cada ion tiene un impacto diferente sobre el potencial de membrana. En la Figura 13.5 se ilustra la magnitud del gradiente de concentración para cada ion en una neurona de mamífero. Cada ion tenderá a difundir a favor de su gradiente electroquímico (mostrado mediante flechas rojas en la Figura 13.5) y, por lo tanto, produce una variación en el potencial de membrana.

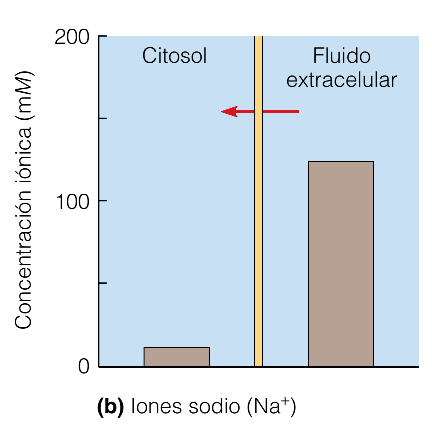
Los iones potasio tienden a difundir hacia fuera de la célula, lo que hace más negativo al potencial de membrana. Los iones sodio tienden a entrar en la célula, forzando el potencial de membrana en dirección positiva y, por lo tanto, provocando una **despolarización** de la membrana (es decir, provocando que el potencial de membrana sea menos negativo). Los iones cloro tienden a difundir hacia el interior de la célula lo que, en principio, hace que el potencial de membrana sea más negativo. Sin embargo, los iones cloro son también repelidos por el potencial negativo de membrana, de forma que los iones cloro entran habitualmente en la célula asociados con iones cargados positivamente como el sodio. Este movimiento emparejado anula el efecto despolarizante de la entrada de sodio. El incremento de la permeabilidad celular al cloro puede tener dos efectos, y ambos disminuyen la excitabilidad neuronal. En primer lugar, la entrada neta de iones cloro (entrada de cloro sin cationes asociados) produce *hiperpolarización* de la membrana (es decir, el potencial de membrana se hace más negativo de lo habitual). En segundo lugar, cuando la membrana se hace permeable a los iones sodio, algunos iones cloro tenderán entrar junto con el sodio. Este efecto de la entrada de cloro será relevante más adelante cuando discutamos los neurotransmisores inhibitorios.

La ecuación de Goldman describe los efectos combinados de los iones sobre el potencial de membrana

Las contribuciones relativas de los principales iones son importantes para el potencial de membrana ya que, incluso en su estado de reposo, la célula muestra cierta permeabilidad a los iones sodio y cloro así como a los iones potasio. Para considerar la filtración de iones sodio y cloro hacia la célula no podemos usar la ecuación de Nerst ya que ésta considera únicamente un tipo de ion cada vez, y asume que este ion está en equilibrio electroquímico. Debemos apartarnos del concepto estático del potencial de equilibrio hacia la consideración de los *movimientos iónicos estacionarios* a través de la membrana.

Podemos ilustrar el concepto de movimientos iónicos estacionarios volviendo una vez más a nuestro modelo de





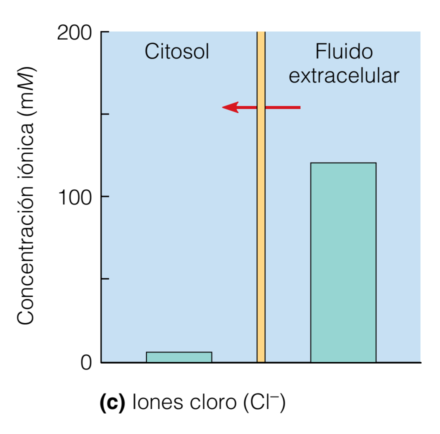


Figura 13.5 Concentraciones relativas de iones potasio, sodio y cloro a través de la membrana plasmática de una neurona de mamífero. Cada uno de los principales iones del citosol se encuentra en un gradiente de concentración a través de la membrana plasmática, y cada uno es capaz de ejercer un efecto sobre el potencial de membrana. La flechas rojas indican la dirección a la cual tiende a fluir el ion en respuesta a su gradiente electroquímico. (**a**) Los iones potasio están más concentrados en el citosol que en el fluido extracelular. Como consecuencia, los iones potasio tienen tendencia a salir de la célula, dejando atrás aniones que permanecen atrapados. Por lo tanto, la pérdida de potasio produce que el potencial de membrana se haga negativo. (**b**) Los iones sodio están mucho más concentrados fuera de la célula que dentro; por lo tanto, los iones sodio tienden a entrar a la célula. A medida que los iones sodio entran, neutralizan parte del exceso de carga negativa en el citosol. Como consecuencia, el potencial de membrana se hace más positivo. (**c**) Los iones cloro habitualmente cruzan la membrana junto a un catión permeable (normalmente un ion potasio). Aunque los iones cloro están concentrados fuera de la célula, la concentración extracelular de iones potasio es baja lo cual limita la tasa de entrada del cloro. Por el contrario, la concentración de potasio en el citosol es elevada, lo que permite la salida de iones cloro de la célula a concentraciones citosólicas de cloro bajas.

una célula en equilibrio electroquímico (Figura 13.6). Recuerde que una célula que es únicamente permeable al potasio tendrá un potencial de membrana igual al potencial de equilibrio para los iones potasio. Bajo estas condiciones, no existirá movimiento neto de potasio hacia fuera de la célula. ¿Qué sucederá si asumimos que la membrana es también ligeramente permeable a los iones sodio? Sabemos que la célula tendrá un gradiente intenso de sodio a través de la membrana así como un potencial de membrana negativo correspondiente al potencial equilibrio del potasio. Estas fuerzas tenderán a mover iones sodio hacia el interior de la célula. A medida que los iones sodio entran, la membrana se despolariza parcialmente. Al tiempo que el potencial de membrana es neutralizado, disminuye la tendencia a evitar la salida de potasio de la célula, de forma que los iones potasio difunden hacia el exterior, neutralizando la entrada del sodio. La entrada de iones sodio desplaza el potencial de membrana en dirección positiva, mientras que el movimiento hacia el exterior de iones potasio desplaza de nuevo el potencial de membrana en dirección negativa.

El movimiento de iones sodio y potasio a través de la membrana tiene, por lo tanto, efectos esencialmente opuestos sobre el potencial de membrana. Para un tipo de axón de calamar, el gradiente de iones sodio tiende hacia un potencial de membrana celular de alrededor de 55 mV, mientras que el gradiente de iones potasio tiende hacia un potencial de membrana de alrededor de −75 mV. ¿A qué valor se alcanzará el potencial de reposo? En principio podría ser en cualquier valor entre esos dos puntos. El potencial de membrana se transforma ahora en una función, no sólo de los gradientes electroquímicos, sino también de la relación a la que fluyen los iones a través de la membrana. En un momento determinado, el potencial de membrana dependerá de la relación entre el movimiento de salida de iones potasio respecto al de entrada de iones sodio. Los cambios en la permeabilidad de la célula a cualquiera de estos iones producen variaciones en el potencial de membrana. En una célula viva, los iones sodio continúan entrando en la célula y los iones potasio salen, pero se mantienen concentraciones estacionarias de ambos iones debido a que la bomba Na^+/K^+ actúa sacando iones sodio y metiendo iones potasio.

Los neurobiólogos pioneros David E. Goldman, Alan Lloyd Hodgkin y Barnard Katz fueron los primeros en describir cómo contribuye cada uno de los gradientes de diversos iones al potencial de membrana, en función de la permeabilidad iónica relativa. La ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz, conocida más comúnmente como ecuación de Goldman es la siguiente:

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{(P_K)[K^+]_{ext} + (P_{Na})[Na^+]_{ext} + (P_{Cl})[Cl^-]_{int}}{(P_K)[K^+]_{int} + (P_{Na})[Na^+]_{int} + (P_{Cl})[Cl^-]_{ext}} \quad \textbf{(13.5)}$$

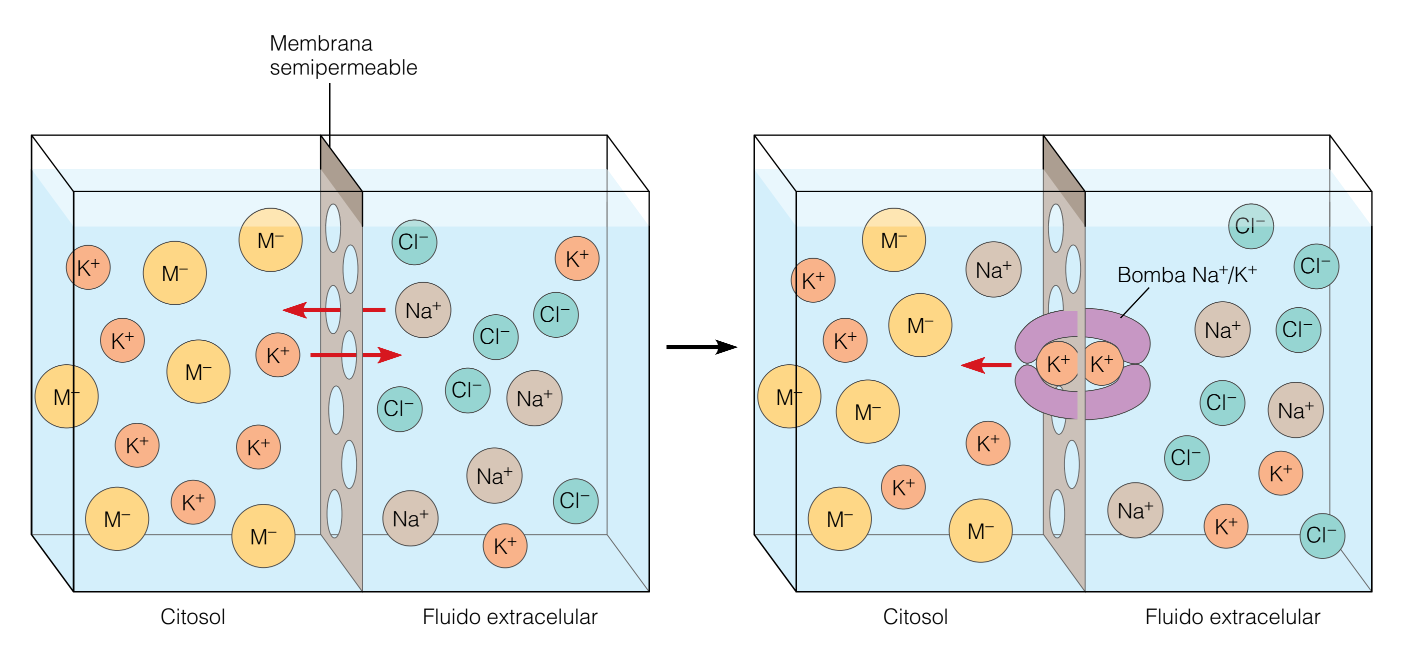


Figura 13.6 Movimientos iónicos estacionarios. El potencial de membrana de una célula depende de la permeabilidad de la membrana plasmática a los distintos iones y del movimiento estacionario de iones a través de la membrana. Como se ilustra en nuestro modelo de dos compartimentos, un componente pequeño de iones sodio entran en la célula de manera continua. Esto hace que el potencial de membrana sea más positivo, disminuyendo la restricción eléctrica al movimiento de los iones potasio. Un pequeño número de iones difunden ahora al exterior de la célula. A medida que los iones de sodio se acumulan en el citosol, éstos son bombeados hacia fuera e intercambiados por iones potasio por la actividad de la bomba Na^+/K^+. (En esta figura, ya se ha bombeado Na^+ hacia el exterior y se está bombeando K^+ hacia el interior.) El resultado final es una concentración baja de iones sodio dentro de la célula cuya presencia produce que el potencial de membrana sea más positivo es que el potencial de equilibrio para los iones potasio.

Debido a la que los iones cloro tienen valencia negativa, $[Cl^-]_{int}$ aparece en el numerador y $[Cl^-]_{ext}$ en el denominador.

Una de las diferencias más importantes entre la ecuación de Nerst y la ecuación de Goldman es la incorporación de términos para la permeabilidad. Aquí P_K, P_{Na} y P_{Cl} son las *permeabilidades relativas* de la membrana para los respectivos iones. El uso de las permeabilidades relativas evita la complicada tarea de determinar la permeabilidad absoluta para cada ion. Mientras que la ecuación mostrada aquí tiene en cuenta únicamente las contribuciones de iones potasio, sodio y cloro, se podrían añadir también otros iones. Sin embargo, con la excepción de circunstancias especiales, la permeabilidad de la membrana plasmática a otros iones es habitualmente tan baja que sus contribuciones son despreciables.

Podemos usar el axón de calamar para ilustrar cómo se puede estimar de manera precisa el potencial de membrana en reposo, a partir de concentraciones estacionarias conocidas y de las permeabilidades relativas de los iones sodio, potasio y cloro. Para hacer esto, asignamos al K^+ un valor de permeabilidad de uno, y los valores de permeabilidad para los otros iones se determinan de manera relativa respecto a la del K^+. Para los axones de calamar, la permeabilidad de los iones sodio es únicamente alrededor del 4% de la de los iones potasio, y para los iones cloro, el valor es del 45%. Los valores relativos de P_K, P_{Na} y P_{Cl} son por lo tanto 1, 0,04 y 0,45, respectivamente. Usando estos valores, a una temperatura de 20 °C y a las concentraciones intracelulares y extracelulares de Na^+, K^+ y Cl^- de la Tabla 13.1, debería ser capaz de estimar en −60,3 mV el potencial de membrana en reposo de un axón de calamar. Los valores que se pueden medir normalmente del potencial de membrana en reposo del axón del calamar están en torno a −60 mV, que es muy semejante a nuestro valor calculado de potencial.

Excitabilidad eléctrica

El establecimiento de un potencial de reposo de la membrana y su dependencia de los gradientes iónicos y de la permeabilidad iónica son propiedades de casi todas las células. La propiedad única de las células excitables consiste en sus respuestas frente a la despolarización de la membrana. Mientras que una célula no excitable que ha sido ligeramente despolarizada de forma temporal vuelve sencillamente a su potencial de reposo, una célula eléctricamente excitable que se despolariza de igual forma responderá mediante la generación de un *potencial de acción.*

Las células eléctricamente excitables producen un potencial de acción debido a la presencia de tipos particulares de canales iónicos en su membrana plasmática. Para comprender cómo se comunican las células nerviosas a través de señales eléctricas, necesitamos conocer las características de los canales iónicos presentes en sus membranas, un tema que abordaremos a continuación.

Los canales iónicos actúan como compuertas para el movimiento de iones a través de la membrana

En el Capítulo 8 introdujimos los canales iónicos, proteínas integrales de membrana que forman poros que conducen iones a través de la bicapa lipídica. Recuerde que los **canales iónicos dependientes de voltaje**, como su nombre sugiere, responden a cambios en el voltaje a través de la membrana. Los canales de sodio y de potasio dependientes de voltaje son responsables del potencial de acción. Por el contrario, los **canales iónicos dependientes del ligando** se abren cuando una molécula en particular se une al canal. (*Ligando* procede de la raíz del latín *ligare* que significa unir.) Algunos canales parecen tener fugas al no cerrar completamente en reposo. Por ejemplo, algunos canales de potasio permiten la fuga de iones potasio, haciendo que las células en reposo tengan cierta permeabilidad a los iones potasio. El conocimiento detallado de la estructura y de la función de los canales de sodio y de potasio dependientes de voltaje es fundamental para la comprensión de los eventos del potencial de acción. Comenzaremos nuestra exploración observando cómo se pueden estudiar experimentalmente los canales iónicos.

Las técnicas de Patch clamp y de biología molecular permiten monitorizar individualmente la actividad de canales iónicos

Nuestra imagen más clara de cómo funcionan los canales proceden de la utilización de una técnica que permite registrar las corrientes que pasan a través de un único canal. Estas técnicas, conocidas como *registro de canal único* o más comúnmente como **patch clamp** (Figura 13.7), fueron desarrolladas por Erwing Neher y Bert Sackman, por lo que recibieron el Premio Nobel en 1991 por su descubrimiento.

Para registrar corrientes de un único canal se presiona cuidadosamente la punta de una micropipeta de vidrio pulida al fuego y con un diámetro de punta de aproximadamente 1 μm, sobre la superficie de una célula como una neurona (Figura 13.7). Se aplica entonces una succión suave de forma que se produce un estrecho sellado entre la pipeta y la membrana plasmática. En este momento se dispone de un parche de membrana bajo la punta de la pipeta que está aislado del medio que lo rodea (Figura 13.7). Este parche es lo suficientemente pequeño para que únicamente contenga uno o pocos canales. La corriente puede entrar y salir de la pipeta solamente a través de esos canales, permitiendo así al experimentador estudiar las propiedades de canales individuales. Los canales pueden estudiarse en la célula intacta o bien el parche puede ser extraído de la célula de forma que el investigador tenga más acceso a la cara citosólica de la membrana.

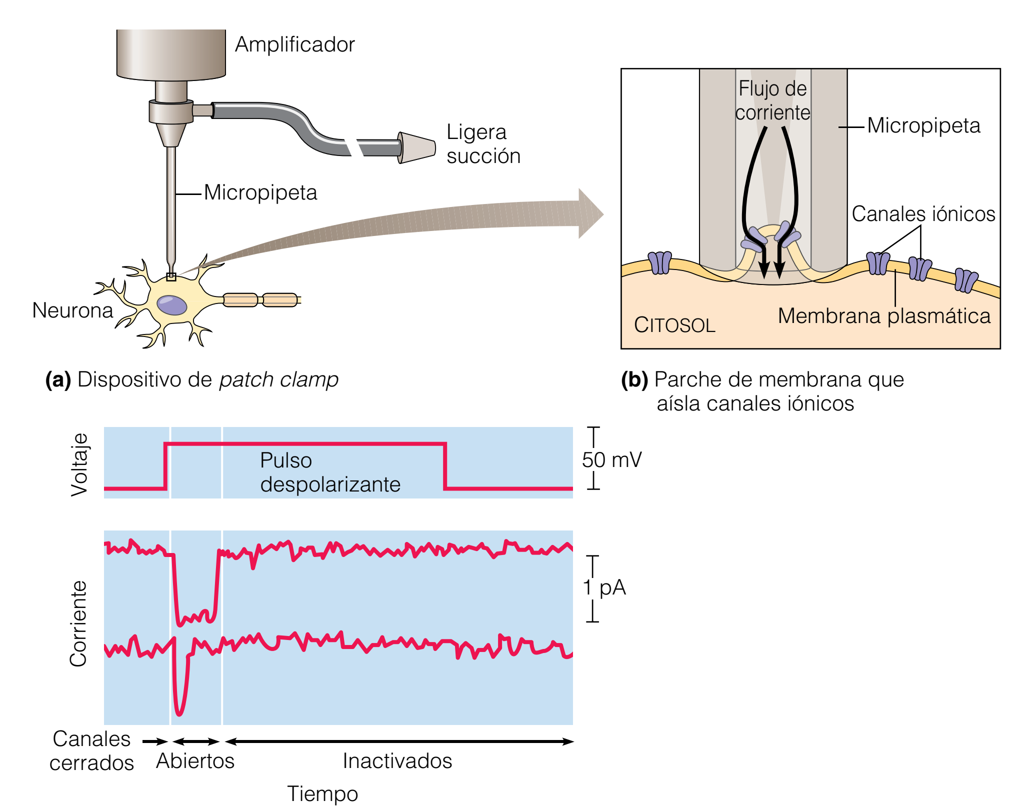


Figura 13.7 Patch clamp. (**a**) Una micropipeta pulida al fuego con un diámetro de alrededor de 1 mm se localiza sobre una célula, como la neurona mostrara la figura y (**b**) se aplica una ligera succión para producir el sellado entre la pipeta y la membrana plasmática. La densidad de canales es normalmente lo suficientemente baja para que existan únicamente uno o unos pocos canales en la porción de membrana comprendida en la boca de las pipeta. (**c**) Cuando se registra el flujo de corriente (flujo de iones) mientras el potencial de membrana se fija mediante un pulso despolarizante, se produce una apertura repentina de canales. Cuando cada canal se abre la cantidad de corriente que fluye a través del canal es siempre la misma (1 pA para los canales iónicos mostrados). A continuación de la apertura repentina de los canales, se produce un periodo quiescente de inactivación de canales.

Durante el proceso experimental se mantiene el voltaje a través de la membrana mediante un amplificador y un sofisticado circuito electrónico recurrente denominado trampa o fijación de voltaje. La fijación de voltaje, mediante la inyección de corriente según sea necesaria, mantiene a la célula en un potencial de membrana constante, independientemente de los cambios en las propiedades eléctricas de la membrana. La fijación de voltaje permite medir pequeños cambios en el flujo de corriente en la micropipeta, corrientes a través de canales únicos.

El método de patch-clamp se ha empleado para mostrar cómo al abrirse, un canal de sodio conduce siempre la misma cantidad de corriente —es decir, el mismo número de iones por unidad de tiempo—. En otras palabras, no existen estados parcialmente abiertos o cerrados, en los que el canal conduce más o menos corriente. Por lo tanto, podemos caracterizar un canal en particular en términos de su conductancia. La conductancia es una medida indirecta de la permeabilidad de un canal cuando se aplica un voltaje concreto a través de la membrana. En términos eléctricos la conductancia es inversa a la resistencia. Para los canales de sodio dependientes de voltaje, cuando se aplica un voltaje de 50 mV a través de la membrana se genera una corriente de aproximadamente un picoamperio ($1 \text{ pA} = 1 \times 10^{-12}$ A). Esta corriente corresponde aproximadamente a 6 millones de iones sodio fluyendo a través del canal por segundo. Esto se puede observar en los registros de la Figura 13.7c.

En los registros de canales únicos, la despolarización de la membrana (producida por cambios en voltaje que se aplica a un potencial más positivo) incrementa la probabilidad de que un canal se abra. Antes de que la membrana sea despolarizada un canal de sodio oscilará ocasionalmente entre los estados abierto y cerrado. Una vez que el canal se abre, no se puede volver a abrir a no ser más el potencial de membrana vuelva a un nivel más negativo. El cese de la actividad del canal que se produce mientras la membrana está todavía despolarizada se debe a la inactivación del canal que discutiremos más adelante en este capítulo.

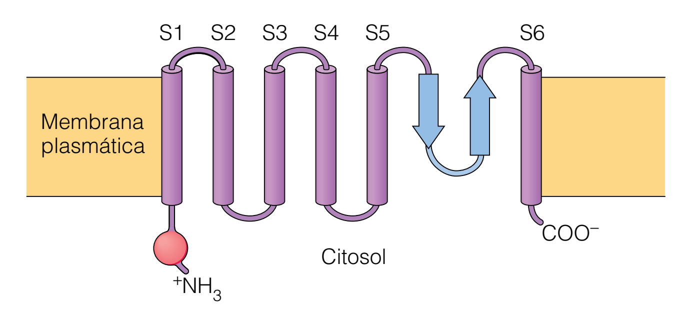
Gran parte de la investigación actual sobre canales iónicos combina las técnicas de patch clamp con técnicas de biología molecular para estudiar cómo detectan y responden a cambios en el potencial de membrana los canales de las membranas excitables. El aislamiento y el clonaje de los genes que codifican proteínas de canales ha hecho posible sintetizar grandes cantidades de proteínas de canales y estudiar sus funciones en bicapas lipídicas o en oocitos de ranas. Se pueden emplear modificaciones moleculares específicas o mutaciones del canal para determinar la implicación de distintas regiones de la proteína del canal en su función. Esta aproximación se ha empleado para estudiar los dominios de los canales de sodio y de potasio responsables de la sensibilidad al voltaje.

Dominios específicos de los canales dependientes de voltaje funcionan como sensores e inactivadores

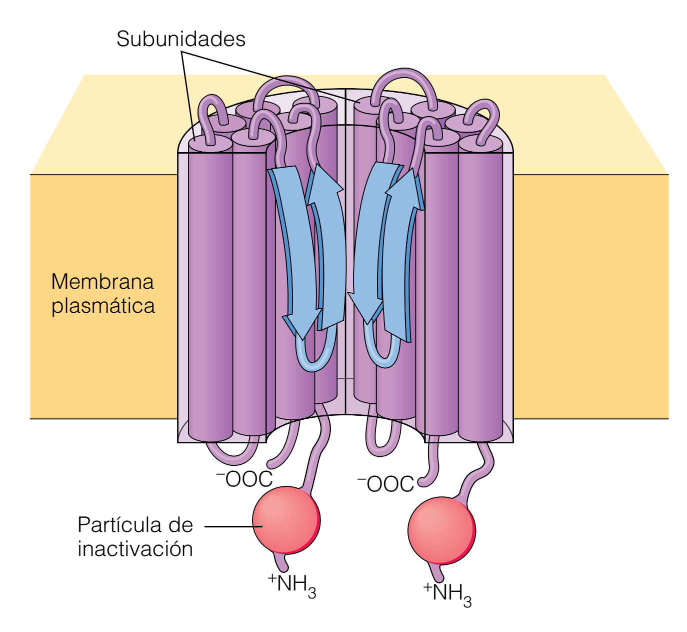
La estructura de los canales iónicos sensibles a voltaje se clasifica en dos categorías distintas, aunque semejantes. Los *canales de potasio dependientes de voltaje* son *proteínas multiméricas*, es decir están compuestos por diversas subunidades proteicas separadas, que se asocian para formar un canal funcional. En el caso de los canales de potasio, se asocian en la membrana cuatro subunidades proteicas formando un poro central a través del cual pueden pasar los iones (Figura 13.8). Roderick Mackinnon recibió el Premio Nobel en química en 2003 en parte por su trabajo sobre la estructura de los canales de potasio dependientes de voltaje. Los *canales de sodio dependientes de voltaje* son, por el contrario, proteínas *monoméricas* (en otras palabras, están formadas por un único polipéptido) con cuatro dominios separados, cada uno de los cuales es semejante a una de las subunidades de los canales de potasio dependientes de voltaje. En ambos tipos de canales, cada subunidad o dominio contiene seis hélices α transmembrana (denominadas subunidades es S1-S6). Una de esas hélices α transmembrana, S4, tiene aminoácidos con grupos cargados positivamente en el medio de su segmento transmembrana. Cuando esos aminoácidos cargados positivamente son reemplazados con aminoácidos neutros, el canal no se abre, lo que sugiere que la hélice transmembrana S4 funciona como sensor de voltaje, que hace que estos canales respondan a variaciones de potencial. Los cambios de voltaje a través de la membrana parecen actuar sobre las cargas de estos aminoácidos, produciendo la apertura o el cierre del canal.

El tamaño del poro central y, de forma más importante, la forma en la que interacciona con un ion confiere al canal su selectividad iónica (Figura 13.9a). En parte, los canales seleccionan los iones con la carga apropiada mediante su atracción electroestática o su repulsión hacia los aminoácidos cargados existentes en la apertura del poro. Sin embargo, los iones se deben unir al canal antes de que puedan atravesarlo. Cuando un ion se une a un canal, se libera la mayoría de las moléculas de agua que tiene unidas. Por lo tanto, un canal selecciona los iones a los que se une con suficiente fuerza como para desplazar las moléculas de agua que rodean al ion. Una vez que esto sucede, el ion puede pasar a través del poro.

Los canales de sodio dependientes de voltaje tienen la capacidad de abrirse en respuesta a algunos estímulos y después volverse a cerrar. El estado de apertura o cierre es un fenómeno todo o nada —es decir, las compuertas no parecen permanecer abiertas parcialmente—. Sin embargo, un canal de sodio puede entrar en dos estados cerrados diferentes. Cuando un canal de sodio se cierra como resultado de una variación en la subunidad S4, un fenómeno conocido como **cierre del canal**, el canal se cierra pero permanece con capacidad para abrirse de nuevo en respuesta a una señal despolarizante (Figura 13.9b). El otro estado cerrado se denomina **inactivación del canal**, que constituye una característica importante de los canales de sodio dependientes de voltaje (Figura 13.9 C.). Cuando un canal se inactiva está cerrado, de forma que no se puede reabrir inmediatamente, incluso

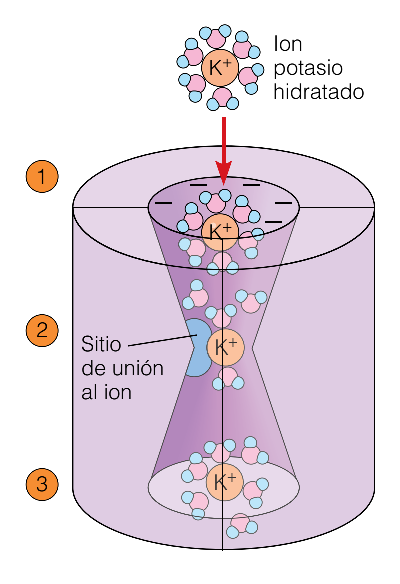


(a) Una subunidad individual

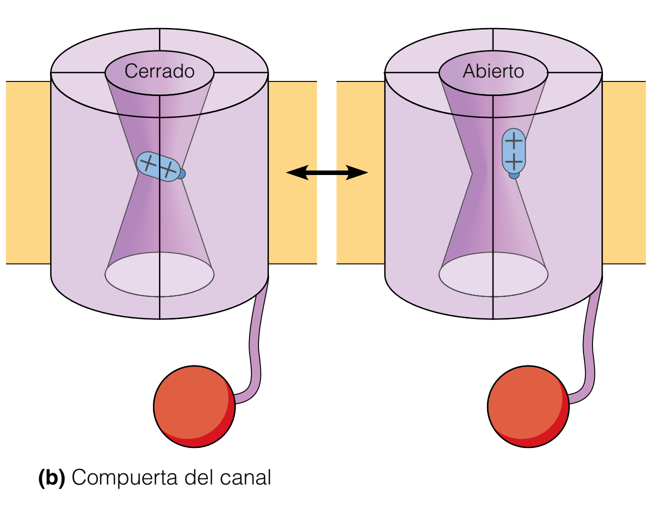


(b) Organización de dos de las cuatro subunidades de un canal

Figura 13.8 Estructura general de los canales iónicos dependientes de voltaje. Los canales dependientes de voltaje para el sodio, potasio y calcio comparten las mismas características estructurales básicas. Un canal es esencialmente un tubo rectangular cuyas cuatro paredes están formadas por o bien cuatro subunidades (esto es, canales de potasio), o cuatro dominios de un único polipéptido (esto es, canales de sodio). (**a**) Cada subunidad o dominio contiene seis α-hélices transmembrana, marcadas como S1-S6. La cuarta α-hélice, S4, contiene numerosos residuos cargados positivamente, lo que hace que sea un buen candidato como mecanismo sensor de voltaje y como parte del mecanismo de compuerta. Para canales de sodio dependientes de voltaje, y algunos tipos de canales de potasio, una región próxima al N-terminal hace relieve hacia el citosol y forma la partícula de inactivación. (**b**) Se representan dos de las cuatro subunidades del canal de potasio dependiente de voltaje, para indicar cómo se forma el poro en el medio. La partícula de inactivación (cuando está presente) produce la inactivación del canal al extenderse sobre la boca del canal y bloquear el paso de iones.



(a) Selectividad iónica de los canales



(b) Compuerta del canal

MEMBRANA
PLASMÁTICA

Partícula
de inactivación

(c) Inactivación del canal

Figura 13.9 Función de un canal iónico depende de voltaje. (**a**) se muestran varias formas mediante las que un canal puede seleccionar distintos tipos de iones. ① Cargas negativas en la entrada del canal repelen aniones y atraen cationes. ② El diámetro del poro restringe el tamaño de los iones que pueden pasar. ③ La unión selectiva del ion elimina moléculas de agua, de forma que los iones pueden pasar a través del poro. (**b**) La apertura y el cierre del canal se produce cuando una porción del canal cambia su conformación al variar el potencial de membrana. En la figura se muestra una de las partículas de inactivación oscilando entre los estados abierto y cerrado. (**c**) la inactivación de los canales de sodio se produce cuando una partícula de inactivación bloquea la apertura del poro.

aunque sea estimulado para ello. Para continuar nuestra analogía con la compuerta, la inactivación del canal es como colocar un candado en una puerta cerrada; únicamente se puede abrir de nuevo la puerta cuando se abre el candado. La inactivación se produce por una porción de la proteína del canal (llamada *partícula de inactivación*) que hace relieve hacia el citosol, de forma parecida a una bola en una cadena (Figura 13.9 C.). Dicha partícula cubre la apertura del poro del canal durante la inactivación. Para que el canal se reactive y se abra en respuesta a un estímulo, la partícula de inactivación se debe apartar del poro. Cuando se trata la cara citosólica de un canal con proteasa o con anticuerpos dirigidos contra el fragmento del canal que se considera responsable de su inactivación, la partícula de inactivación no puede continuar funcionando y por lo tanto los canales no se pueden volver a inactivar.

Como veremos en las siguientes secciones de este capítulo, la regulación de los canales iónicos es crucial para el funcionamiento correcto de las neuronas. Recientemente se han asociado numerosos defectos en diversos canales iónicos dependientes de voltaje con enfermedades neurológicas humanas (estos efectos se han denominado «canalopatías»). Por ejemplo, los humanos que tienen una mutación en algunos canales de potasio desarrollan ataxia (un defecto en la coordinación muscular) y una de las formas de epilepsia se produce por la mutación de un tipo de canal de sodio dependiente de voltaje.

Potencial de acción

Hemos visto cómo un gradiente iónico a través de una membrana con permeabilidad selectiva puede generar un potencial de membrana y cómo, de acuerdo con la ecuación de Goldman, el potencial de membrana variará en respuesta a los cambios en la permeabilidad iónica. Hemos examinado también la naturaleza de los canales iónicos de la membrana, que regulan la permeabilidad de la membra-

na a diferentes iones. Ahora estamos preparados para estudiar cómo la apertura y el cierre coordinado de canales iónicos pueden conducir a un potencial de acción. Comenzaremos examinando cómo se mide el potencial de membrana y cómo varía durante un potencial de acción.

Uno de los grandes avances técnicos en la comprensión de los fenómenos eléctricos de las neuronas procede del descubrimiento en los años 30 de los axones gigantes del calamar. Estas fibras nerviosas estimulan la expulsión repentina de agua de la cavidad del manto del calamar, posibilitando una rápida propulsión que les permite escaparse de los depredadores (Figura 13.10). El **axón gigante de calamar** tiene un diámetro de alrededor de 0,5-1 mm, lo que le permite insertar fácilmente microelectrodos para medir y controlar los potenciales eléctricos y las corrientes iónicas a través de la membrana axonal. La Figura 13.11 ilustra el método empleado para hacer esto. Alan Hodgkin y Andrew Huxley usaron el axón gigante de calamar para aprender cómo se generan los potenciales de acción. Desde su descubrimiento, el axón gigante de calamar se ha transformado en uno de los axones estudiados de forma más exhaustiva y mejor caracterizados, y lo utilizaremos como modelo para nuestra discusión.

Los potenciales de acción propagan señales eléctricas a lo largo de un axón

Una neurona en reposo es un sistema preparado para la acción eléctrica. Como hemos visto, el potencial de membrana de una célula se establece por el delicado equilibrio de los gradientes iónicos y la permeabilidad a los iones. La despolarización de una membrana distorsiona este equilibrio. Si el nivel de despolarización es pequeño —menos de

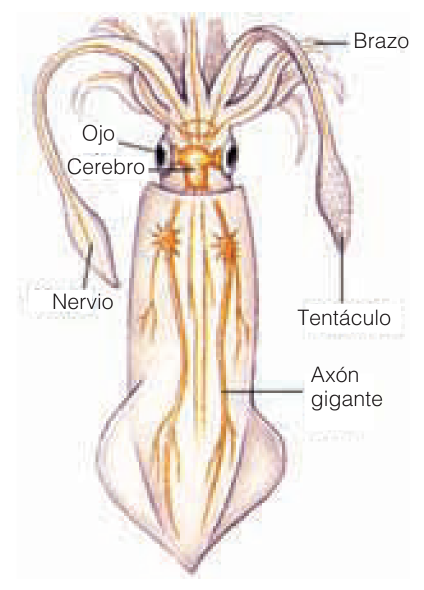
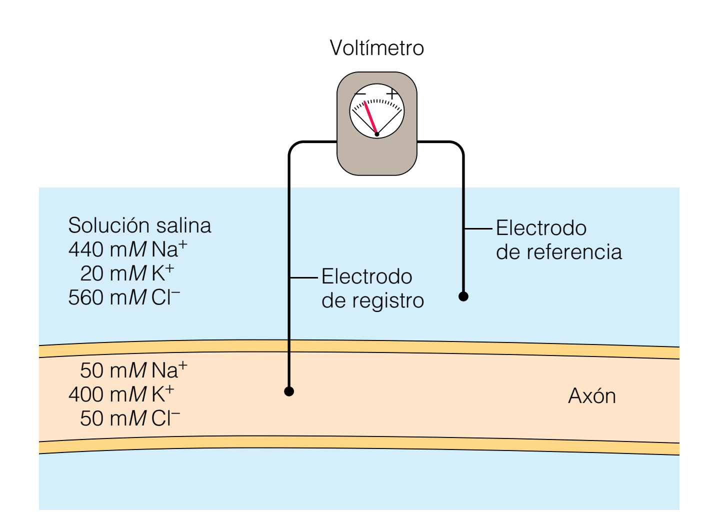
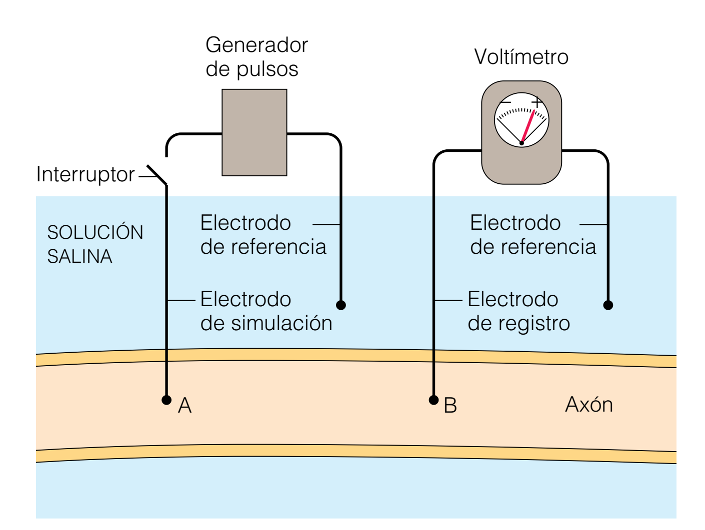


Figura 13.10 Axones gigantes de calamar. El sistema nervioso del calamar incluye neuronas motoras que controlan los movimientos natatorios. Los nervios contienen axones gigantes (fibras) con diámetros de hasta 1 mm, siendo un sistema apropiado para estudiar los potenciales de reposo y de acción en una membrana biológica.



(a) Medición del potencial de membrana en reposo en un axón de calamar



(b) Medición de un potencial de acción en un axón de calamar

Figura 13.11 Aparato para medir los potenciales en membrana. (**a**) La medición del potencial de membrana en reposo requiere dos electrodos, uno insertado en el interior del axón (electrodo de registro) y otro localizado en el fluido que rodea a la célula (electrodo de referencia). Las diferencias de potencial entre los electrodos de registro y de referencia se amplifican mediante un amplificador de voltaje y se muestran en un voltímetro, un osciloscopio o un monitor de ordenador. (**b**) La medición de un potencial de acción requiere cuatro electrodos, uno de estimulación en el axón, otro de registro en el axón y dos de referencia en el fluido que rodea la célula. El electrodo de estimulación está conectado a un generador de pulsos, que genera un pulso de corriente en el axón cuando se activa momentáneamente el interruptor. El impulso nervioso que esto genera se propaga a lo largo del axón y se puede detectar algunos milisegundos después con el electrodo de registro. El impulso se detecta como un cambio transitorio en el potencial transmembrana, medido con respecto al electrodo de referencia.

alrededor de 20 mV—, el potencial del membrana retornará normalmente a niveles de reposo sin tener más consecuencias. La despolarización adicional aproximada membrana al **potencial umbral**. Por encima del potencial umbral, la membrana de las células nerviosas sufre alteraciones rápidas y dramáticas en sus propiedades eléctricas y en su permeabilidad a los iones lo que inicia un potencial de acción.

Un **potencial de acción** es una despolarización eléctrica y repolarización breve pero intensa de la membrana plasmática, producida por el movimiento de entrada de iones sodio y el posterior movimiento de salida de iones potasio. Estos movimientos iónicos están controlados por la apertura y el cierre de canales de sodio y potasio dependientes de voltaje. De hecho, podemos explicar el desarrollo de un potencial de acción únicamente en términos del comportamiento de estos canales. Una vez que se inicia un potencial de acción en una región de la membrana, éste viaja a lo largo de la membrana desde el punto de origen, mediante un proceso denominado **propagación**.

Los potenciales de acción implican cambios rápidos en el potencial de la membrana del axón

El desarrollo y la propagación de un potencial de acción puede ser estudiado en axones largos, como el del calamar, usando un aparato semejante al que se muestra en la Figura 13.11a. Un electrodo llamado *electrodo de estimulación* se conecta a una fuente de corriente y se inserta en el axón a una cierta distancia del electrodo de registro (Figura 13.11b). Un pulso breve del electrodo de estimulación despolariza la membrana alrededor de 20 mV (por ejemplo, de −60 a aproximadamente −40 mV), situando a la neurona por encima del potencial umbral. Esto produce un potencial de acción que se propaga desde el electrodo de estimulación. Al tiempo que el potencial de acción pasa por el electrodo de registro, el voltímetro o el osciloscopio mostrarán el patrón característico de los cambios en el potencial de membrana como se ilustra en la Figura 13.12.

En menos de un milisegundo, el potencial de membrana se incrementa dramáticamente desde el valor de potencial de reposo hasta alrededor de 40 mV —el interior de la membrana de hecho se hace positivo durante un breve periodo—. El potencial entonces cae de manera más lenta, hasta valores de alrededor de −75 mV (periodo llamado hiperpolarización) antes de estabilizarse de nuevo en un valor de reposo de −60 mV. Como indica la Figura 13.12, la secuencia completa de procesos durante un potencial de acción se produce en unos pocos milisegundos.

Se puede emplear también el aparato mostrado en la Figura 13.11 para medir las corrientes iónicas que fluyen a través de la membrana en distintas fases del potencial de acción. Para hacer esto, se insertan en la célula un electrodo adicional que conecta a un fijador de voltaje posibilitando al investigador fijar y mantener la membrana en un

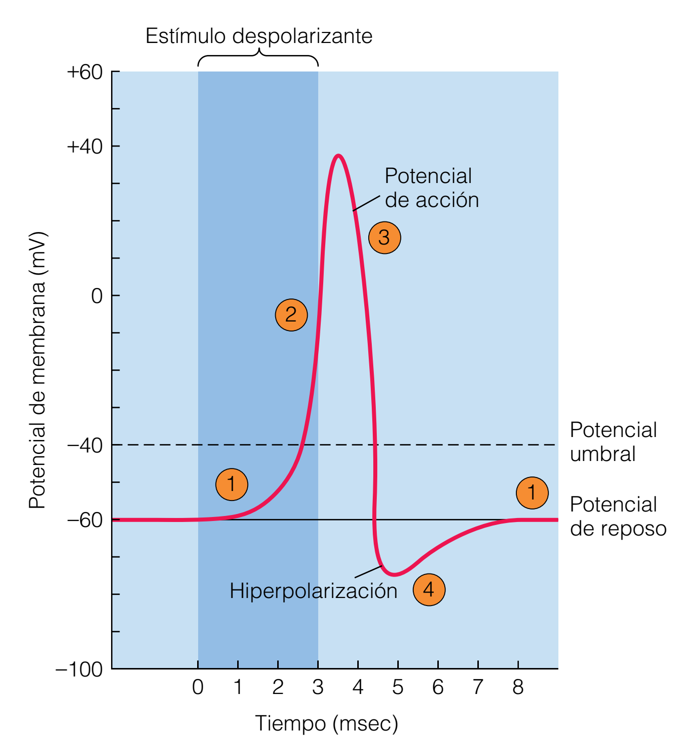


Figura 13.12 El potencial de acción del axón de calamar. ① El potencial de reposo previo al inicio del potencial de acción es aproximadamente de −60 mV. ② Un potencial de acción comienza cuando la neurona es despolarizada alrededor de 20 mV, hasta un punto conocido como el potencial umbral. Una vez que se inicia el potencial de acción, el potencial cambia rápidamente en dirección positiva. En el pico de la onda positiva, el potencial de membrana alcanza un valor de alrededor de 40 mV. ③ una vez que la célula alcanza el pico de potencial positivo, comienza a repolarizarse, retornando a un potencial de membrana negativo. ④ La repolarización a menudo conduce al potencial de membrana a estar hiperpolarizado, más negativo es el potencial de reposo. Posteriormente el potencial de membrana retorna a su estado de reposo.

particular valor de potencial, independientemente de los cambios en las propiedades eléctricas de la membrana. Un investigador puede medir el flujo de corriente a través de la membrana a cualquier valor de potencial de membrana utilizando el dispositivo de fijación de voltaje. Estos experimentos han contribuido de manera fundamental a nuestro conocimiento actual de los mecanismos que producen el potencial de acción.

Los potenciales de acción son consecuencia del rápido movimiento de iones a través de los canales de la membrana axonal

En una neurona en reposo, los canales de sodio y de potasio dependientes de voltaje están normalmente cerrados. Debido a la fuga a través de los canales de potasio, la célula es, en esta situación, aproximadamente 100 veces más permeable a iones potasio que a iones sodio. Cuando una región de una célula nerviosa es despolarizada ligeramen-

te, una fracción de los canales de sodio responde y se abren. Al hacerlo, el incremento de la corriente de sodio actúa para despolarizar más la membrana. Esta relación entre la despolarización, la apertura de los canales de sodio dependientes de voltaje y el incremento de la corriente de sodio constituye un ciclo retroalimentado conocido como *ciclo de Hodgkin.*

Despolarización subumbral. Si no existiesen otros factores que se oponen al ciclo de Hodgkin, incluso la entrada de una pequeña cantidad de sodio a la célula podría siempre conducir a una despolarización completa de la membrana. Sin embargo, el movimiento hacia fuera de iones de potasio restaura el potencial de reposo de la membrana. Como se mencionó anteriormente, cuando se despolariza la membrana ligeramente, el potencial de membrana se repone y no se generan potenciales de acción. Los niveles de despolarización demasiado pequeños para producir un potencial acción se denominan *despolarizaciones subumbral.*

La fase de despolarización. Si todos los canales de sodio dependientes de voltaje de la membrana se abriesen a la vez, la célula se haría repentinamente 10 veces más permeable al sodio que al potasio. Debido es el sodio sería entonces el ion más permeable, el potencial de membrana estaría en gran medida en función del gradiente del ion sodio. Efectivamente, esto es lo que sucede cuando la membrana se despolariza por encima del potencial umbral (Figura 13.13, ① y ②). Una vez que se alcanza el potencial umbral, la salida de potasio no puede compensar la tasa de entrada de sodio. En este momento, el potencial de membrana se eleva rápidamente. Cuando la tasa de entrada de sodio supera ligeramente la tasa máxima de salida de potasio se genera un potencial de acción. Cuando el potencial de membrana alcanza su máximo, aproximadamente a 40 mV, el potencial se aproxima, aunque realmente no lo alcance, al potencial de equilibrio de los iones sodio (alrededor de 55 mV).

La fase de repolarización. Una vez que potencial de membrana ha alcanzado su pico, la membrana se repolariza rápidamente (Figura 13.13, ③). Esto es debido a la combinación de la inactivación de los canales de sodio y a la apertura de canales de potasio dependientes de voltaje. Cuando los canales de sodio se inactivan, éstos se cierran y permanecen cerrados hasta que el potencial de membrana se hace otra vez negativo. La inactivación de los canales, por tanto, detiene el flujo de entrada de iones sodio. La célula en este momento se repolariza automáticamente a medida que los iones potasio salen de ella.

La diferencia en la velocidad de respuesta entre los canales de potasio dependientes de voltaje y los canales de sodio dependientes de voltaje desempeña un papel importante en la generación del potencial de acción. Cuando una célula se despolariza, los canales de potasio se abren más lentamente. Como resultado, un potencial de acción comienza con el incremento en la permeabilidad de la membrana al sodio, que despolariza la membrana, seguido de un incremento en la permeabilidad del potasio, que repolariza membrana.

La fase de hiperpolarización. La mayoría de las neuronas muestran una hiperpolarización transitoria al final de un potencial de acción, en la que brevemente el potencial de membrana se hace incluso más negativo de lo que normalmente es en estado de reposo (Figura 13.13, ④). La hiperpolarización se produce debido al incremento en la permeabilidad al potasio al estar abiertos los canales de potasio dependientes de voltaje. Nótese que el potencial de la hiperpolarización se aproxima al potencial equilibrio para los iones potasio (alrededor de -75 mV en el axón de calamar). A medida que los canales de potasio dependientes de voltaje se cierran, el potencial de membrana vuelve a su estado de reposo original. Véase que la recuperación del potencial de reposo posterior a un potencial de acción no emplea la bomba Na^+/K^+, pero conlleva el movimiento pasivo de iones. Las células que han sido tratadas con un inhibidor metabólico de forma que son incapaces de producir ATP (y por lo tanto sus bombas Na^+/K^+ no lo pueden usar) todavía pueden generar potenciales de acción.

Los periodos refractarios. Después de generar un potencial de acción, es imposible generar otro durante algunos milisegundos. Durante ese intervalo, conocido como **periodo refractario absoluto**, los canales de sodio están inactivados y no se pueden abrir mediante despolarización. Durante el periodo de hiperpolarización, cuando los canales de sodio se han reactivado y son capaces de abrirse de nuevo, es posible pero difícil generar un potencial de acción, ya que las corrientes se oponen a corrientes de potasio más grandes. Ese intervalo se conoce como **periodo refractario relativo**.

Cambios en las concentraciones iónicas debidos al potencial acción. Nuestra discusión sobre los movimientos de los iones pueden dar la impresión de que un potencial acción implica grandes cambios en las concentraciones citosólicas de los iones sodio y potasio. De hecho, durante un único potencial de acción, la concentración celular de iones sodio y potasio prácticamente no cambia. Recuerde que el potencial de membrana se debe a un ligero exceso de carga negativa en un lado y a un ligero exceso de carga positiva del otro lado de la membrana. El número de cargas adicionales en una pequeña fracción de los iones totales de la célula, y el número de iones quieren cruzar la membrana para neutralizar o alterar el equilibrio de cargas es igualmente pequeño.

Sin embargo, la actividad neuronal intensa puede conducir a cambios significativos en las concentraciones iónicas globales. Por ejemplo, mientras una neurona continúa generando gran cantidad de potenciales de acción, la con-

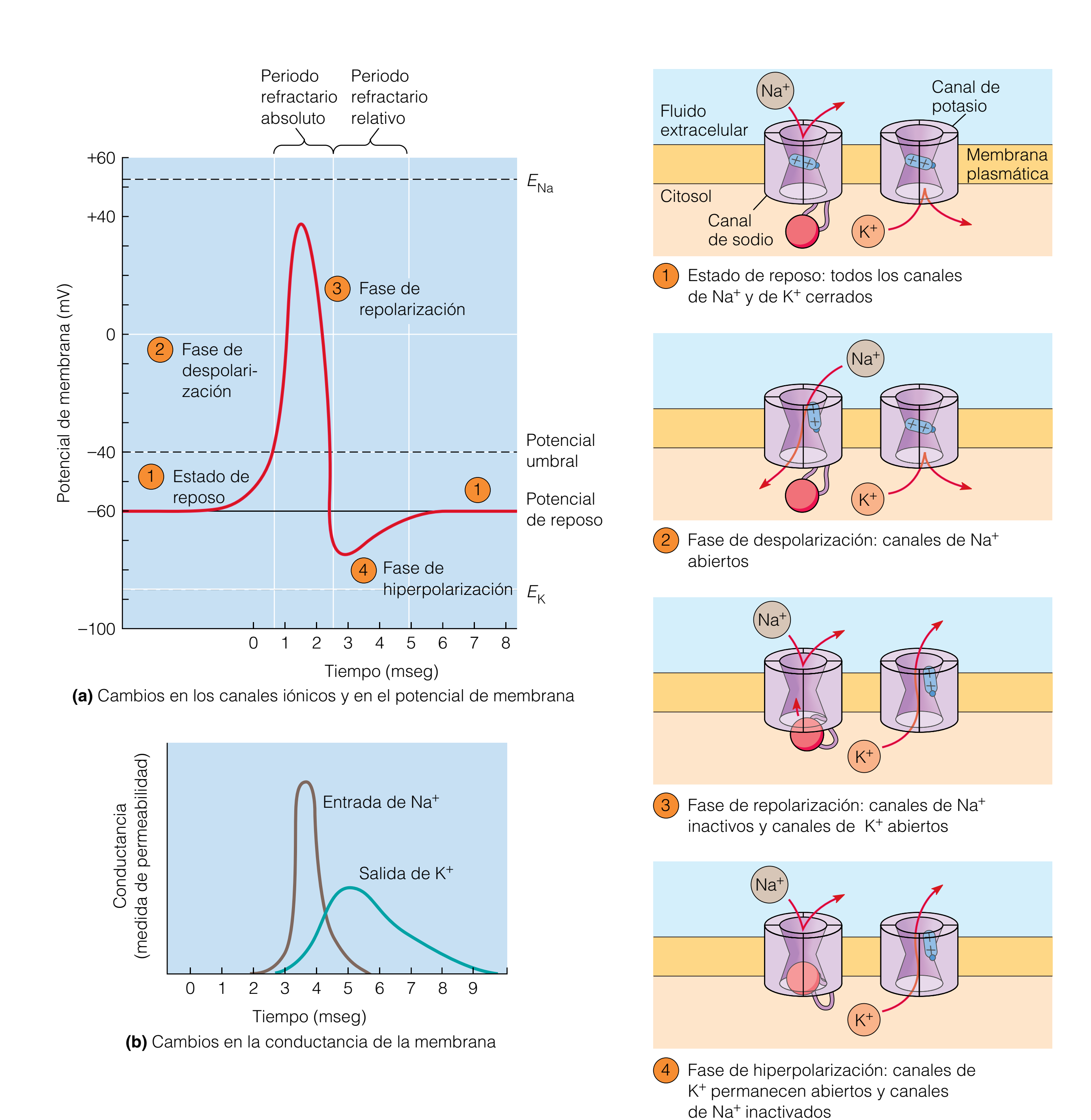


Figura 13.13 **Cambios en los canales iónicos y en las corrientes de la membrana de un axón de calamar durante un potencial de acción.** (**a**) Variación en el potencial de membrana causada por el movimiento de Na^+ y K^+ a través de canales diferentes de voltaje, que se muestran paso a paso a la derecha. El periodo refractario absoluto está producido por la inactivación de los canales de sodio. Obsérvese que, en el pico del potencial de acción, el potencial de membrana se aproxima al E_{Na} (potencial de equilibrio del sodio) con un valor de 55 mV; de forma semejante, el potencial hiperpolarizado se aproxima a E_K (potencial de equilibrio del potasio) con un valor de aproximadamente −75 mV. (**b**) Cambios en la conductancia de la membrana (permeabilidad de la membrana a iones específicos). La membrana despolarizada se vuelve inicialmente muy permeable a los iones sodio, facilitando la entrada masiva de sodio. Posteriormente, a medida que la permeabilidad al sodio disminuye, la permeabilidad de la membrana al potasio se incrementa transitoriamente, produciendo que la membrana se hiperpolarize.

centración de potasio fuera de la célula comienza a incrementarse de manera perceptible. Esto puede afectar al potencial de membrana tanto de la propia neurona como de las células adyacentes. Los astrocitos, las células gliales formadoras de la barrera hematoencefálica, controlan este problema captando el exceso de iones potasio.

Los potenciales de acción se propagan a lo largo del axón sin perder intensidad

Para que las neuronas puedan transmitir señales entre ellas, la despolarización y repolarización transitoria que se produce durante un potencial de acción debe propagarse a lo largo de la membrana neuronal. La despolarización en un punto de la membrana se transmite a regiones adyacentes a través de un proceso denominado **difusión pasiva de la despolarización**. Al tiempo que una onda de despolarización difunde pasivamente desde su punto de origen se produce una disminución de su magnitud. Esta pérdida de intensidad de la despolarización con la distancia respecto al punto de origen hace difícil que las señales se propaguen a largas distancias únicamente de manera pasiva. Para la propagación de señales a largas distancias, el potencial de acción debe ser generado activamente punto a punto a lo largo de la membrana.

Para entender la diferencia entre la difusión pasiva de la despolarización y la propagación de un potencial de acción, considere cómo viaja una señal a lo largo de la neurona desde el punto de origen en las dendritas hasta el final de un axón (Figura 13.14). Las señales que llegan a una neurona son transmitidas por la sinapsis que forman puntos de contacto entre los terminales axónicos de la neurona transmisora y las dendritas de la neurona receptora. Cuando esas señales entrantes despolarizan las dendritas de la neurona receptora, la despolarización difunde pasivamente por la membrana desde las dendritas hasta la base del axón, **el cono axónico**. El cono axónico es la región donde se generan más fácilmente los potenciales acción. Esto se debe a que los canales de sodio se distribuyen dispersamente en las dendritas y en el cuerpo celular pero se concentran en el cono axónico y en los nodos de Ranvier; una cierta despolarización producirá una mayor cantidad de entrada de sodio en aquellos lugares donde los canales de sodio son abundantes. Los potenciales de acción iniciados en el cono axónico son posteriormente propagados a lo largo del axón.

En la Figura 13.15 se ilustran los mecanismos para la propagación del potencial de acción en las células nerviosas no mielinizadas. La estimulación en un punto P de una membrana en reposo produce una despolarización de la membrana y una entrada repentina de iones sodio en esa localización del axón. La polaridad de la membrana revierte temporalmente en ese punto, y esa despolarización se propaga a un punto adyacente *Q*. La despolarización del punto *Q* es suficiente para elevarlo por encima del potencial umbral desencadenando la entrada repentina de iones sodio. En este momento, la membrana en el punto P se ha hecho altamente permeable a los iones potasio. A medida que los iones potasio salen de la célula se restaura la polaridad negativa, y esa porción de la membrana vuelve a su estado de reposo.

Al mismo tiempo, los eventos en *Q* han estimulado la membrana en la región vecina *R*, iniciando la misma secuencia de eventos en ese lugar, y la despolarización entonces se desplaza al punto *S*. En este recorrido, la señal se mueve a lo largo de la membrana como una onda de eventos de despolarización-repolarización, con una reversión de la polaridad de la membrana en las regiones inmediatamente adyacentes a la señal, que retorna de nuevo la normalidad a medida que la señal viaja a lo largo del axón. La propagación de este ciclo de eventos a lo largo de la fibra nerviosa se denomina propagación del potencial de acción o **impulso nervioso**. El impulso nervioso únicamente se puede *alejar* del sitio inicial de despolarización, ya que los canales de sodio que acaban de ser despolarizados se encuentran en estado inactivado y no puedan responder inmediatamente a la estimulación adicional.

Debido a que el potencial acción se propaga activamente, no decae a medida que se propaga. La razón es porque en cada punto sucesivo a lo largo la membrana se genera de nuevo un evento todo-o-nada. Así, un impulso nervioso se puede transmitir a lo largo de esencialmente cualquier distancia sin disminución en su intensidad.

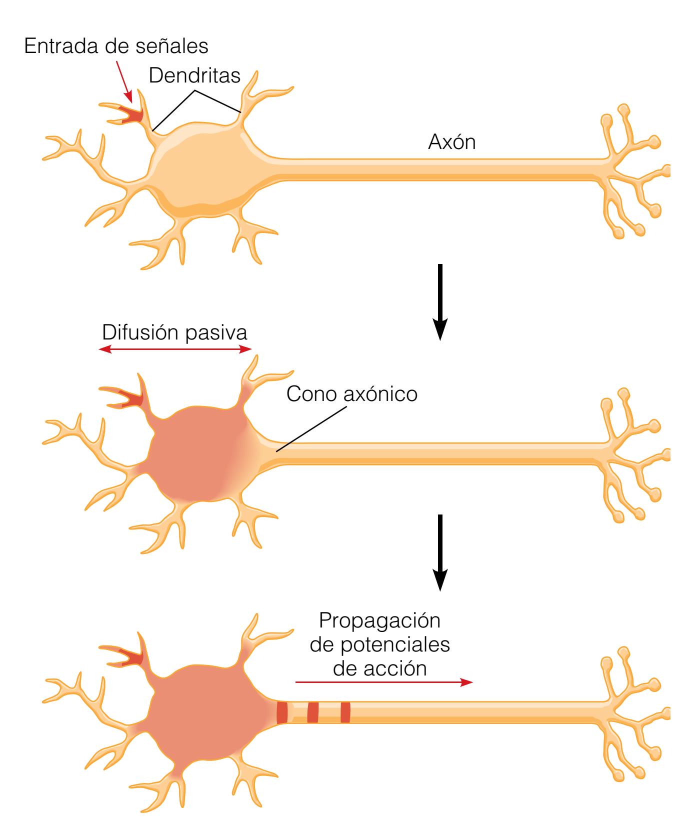


Figura 13.14 Difusión pasiva de la despolarización y propagación de los potenciales de acción de una neurona. La transmisión de un impulso nervioso a lo largo una neurona depende tanto de la difusión pasiva de la despolarización como de la propagación de los potenciales de acción. Una neurona es estimulada cuando sus dendritas reciben estímulos despolarizantes de otras neuronas. La despolarización iniciada en la dendrita difunde pasivamente a través del cuerpo celular hasta el cono axónico, donde se forma un potencial de acción. El potencial de acción se propaga entonces a lo largo del axón.

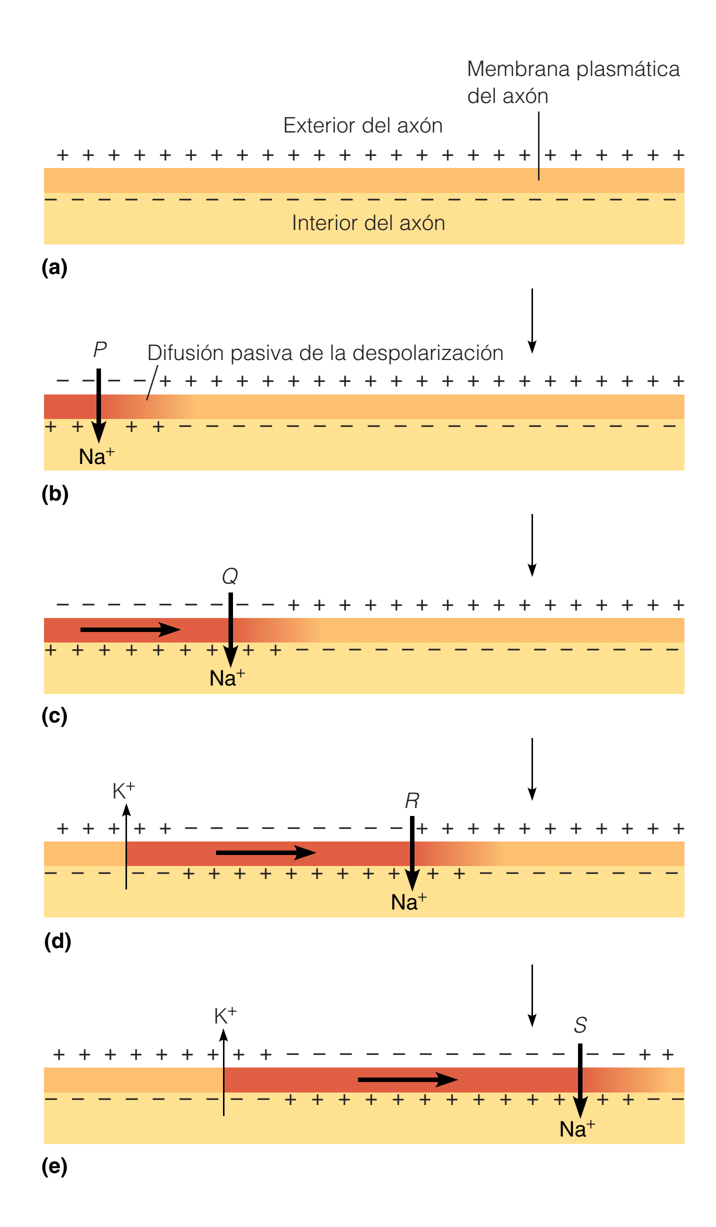


Figura 13.15 Transmisión de un potencial de acción a lo largo de un axón no mielinizado. Un axón no mielinizado se puede considerar como un conjunto infinito de puntos, cada uno de los cuales es capaz de generar un potencial de acción. Para simplificar, consideraremos únicamente cuatro puntos *P*, *Q*, *R* y *S*, que representan regiones adyacentes a lo largo de la membrana plasmática del axón. (**a**) La membrana está inicialmente polarizada completamente. (**b**) Cuando se inicia un potencial de acción en el punto *P*, esta región de la membrana se despolariza y tiene brevemente un potencial positivo. Como resultado, las regiones adyacentes se despolarizan. (**c**) Cuando el punto *Q* adyacente es despolarizado hasta su umbral, se inicia en él un potencial acción. (**d**) Mientras tanto, el punto *P* se está recobrando de su potencial de acción y se ha repolarizado, debido al flujo de salida de iones potasio. El potencial de acción en el punto *Q* continúa su propagación en dirección al punto *R* (no se puede propagar retrógradamente hacia el punto *P* porque los canales de sodio están en un estado refractario, o inactivado, y la membrana en esa región se ha hiperpolarizado). La difusión de la despolarización desde el punto *Q* desencadenará un potencial de acción en *R*. (**e**) De la misma manera, la despolarización del punto *R* desencadenará finalmente un potencial de acción en el punto *S*.

La vaina de mielina actúa como un aislante eléctrico rodeando al axón

La mayoría de los axones de vertebrados tienen una especialización adicional: están rodeados por una *vaina de mielina* discontinua que consiste en muchas capas concéntricas de membrana. La vaina de mielina es un aislante eléctrico razonablemente efectivo para los segmentos del axón a los que rodea. La vaina de mielina de neuronas en el CNS está formada por **oligodendrocitos** y en el PNS por **células de Schwann** (*véase* Figura 13.2) cada una de las cuales envuelve capa a capa al axón con su propia membrana plasmática, formando una espiral compacta (Figura 13.16). Debido a que cada célula de Schwann rodea un segmento corto (alrededor de 1 mm) de un único axón, se requieren numerosas células de Schwann para rodear un axón del PNS con una vaina discontinua de mielina. La mielinización disminuye la capacidad de la membrana neuronal de retener carga eléctrica (por ejemplo, la mielinización disminuye la capacitancia de un axón), permitiendo a un evento de despolarización propagarse más lejos y más rápido de lo que lo haría en un axón no mielinizado.

Sin embargo, la mielinización no elimina la necesidad de propagación. Para que la despolarización se extienda desde un punto al resto de la neurona, el potencial de acción debe ser todavía renovado periódicamente a lo largo del axón. Esto sucede en los nodos de Ranvier, interrupciones de la capa de mielina que están separadas por espacios lo suficientemente pequeños (1-2 mm) para asegurar que la propagación de la despolarización de un potencial de acción desde un nodo es lo suficientemente fuerte para situar a algún nodo adyacente por encima de su potencial umbral (Figura 13.17). Los nodos de Ranvier son los únicos lugares de un axón mielinizado en los que se pueden generar potenciales de acción, ya que es donde se concentran los canales de sodio dependientes de voltaje. Así, en lugar de moverse

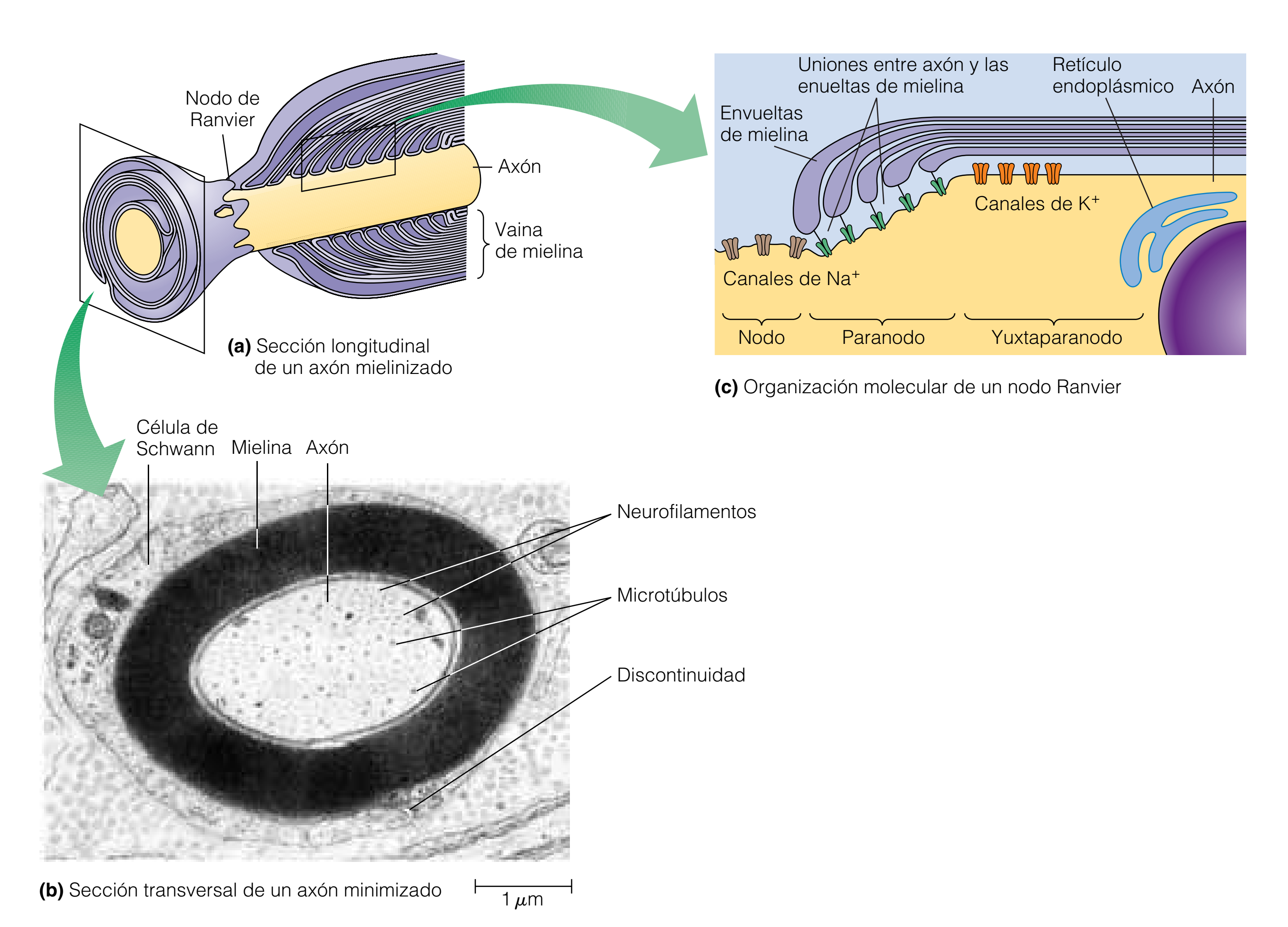


Figura 13.16 **Mielinización de axones.** (**a**) Axón del sistema nervioso periférico que ha sido mielinizado por una célula de Schwann. Cada célula de Schwann da lugar a un segmento de la vaina de mielina por el enrollamiento concéntrico de su membrana alrededor del axón. Las capas de mielina van terminando, una a una, al aproximarse a un nodo de Ranvier, dejando expuesta la membrana del axón. (**b**) Sección transversal de un axón mielinizado del sistema nervioso del gato, que muestra las capas concéntricas de membrana que han sido enrolladas en torno al axón por la célula de Schwann que los rodea. La discontinuidad en la membrana plasmática de la célula de Schwann es el punto en el que la membrana se invaginó inicialmente, para envolver al axón. Los neurofilamentos y microtúbulos se discutirán en el Capítulo 15. (TEM). (**c**) Organización típica de un nodo de Ranvier en el sistema nervioso periférico. Los canales de sodio (marrón) se concentran en el nodo. Las envueltas en mielina se unen a las regiones adyacentes al nodo (región «paranodal») a través de proteínas de la membrana axonal y de las envueltas en mielina (verde). Los canales de potasio (naranja) se agrupan en las proximidades de las regiones paranodales.

como una onda constante a lo largo de la membrana, los potenciales de acción saltan de nodo a nodo a lo largo de los axones mielinizados. Esta denominada *propagación saltatoria* es mucho más rápida que la propagación continua que ocurre en los axones no mielinizados (saltatorio deriva de la palabra del latín para «bailar»; *véase* Figura 13.17). La mielinización es una característica crucial de los axones de mamíferos. La enfermedad humana debilitante esclerosis múltiple se produce cuando el sistema inmune en un paciente ataca sus propias fibras nerviosas mielinizadas, destruyendo sus propiedades de conducción. Si los nervios afectados inervan músculos, la capacidad para el movimiento del paciente se podrá ver comprometida seriamente.

Los nodos de Ranvier son estructuras altamente organizadas que implican un contacto estrecho de las envueltas de las células gliales o de Schwann y la membrana plasmática del axón al que mielinizan. Existen tres regiones distintas asociadas con estos sitios de contacto especializados. En el propio nodo de Ranvier, existe una alta concentración de canales de sodio dependientes de voltaje. En las regiones adyacentes denominadas regiones paranodales («para» significa «junto a») las membranas axonal y glial contienen proteínas transmembrana especializadas. Finalmente en la región próxima a las áreas paranodales, denominadas regiones yuxtaparanodales («yuxta» significa «próximo a»), los canales de potasio se concentran con una densidad elevada (Figura 13.16c). La organización de los nodos de Ranvier evita el movimiento libre de los canales de sodio de potasio dentro de la membrana plasmática del axón hacia regiones adyacentes a los nodos.

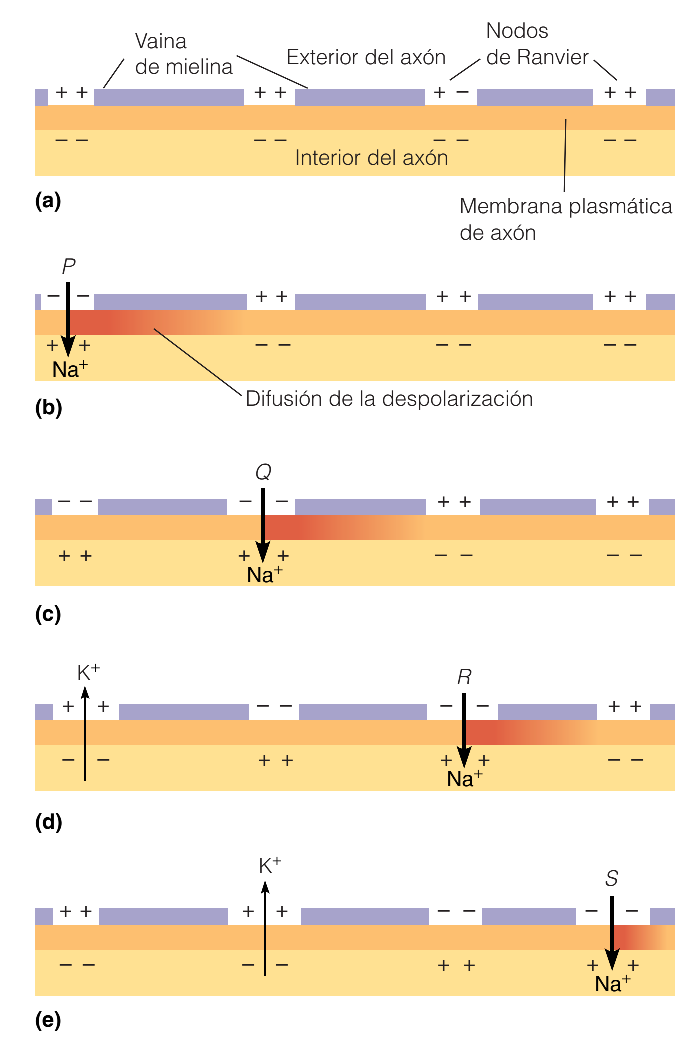


Figura 13.17 Transmisión de un potencial de acción a lo largo de un axón mielinizado. La mielinización reduce la capacitancia de la membrana, permitiendo por lo tanto que una determinada cantidad de corriente de sodio entre en un punto de la membrana, y difunda a lo largo de la membrana mucho más lejos que en la ausencia de mielina. (**a**) En las neuronas mielinizadas se genera un potencial de acción en el cono axónico, justo antes del comienzo de la vaina de mielina. La despolarización difunde entonces a lo largo del axón. Los potenciales de acción se pueden generar únicamente en los nodos de Ranvier, representados aquí mediante los puntos *P, Q, R* y *S*. (**b**) Con la mielinización, la despolarización del punto *P* difunde pasivamente todo el camino hasta el punto *Q* y (**c**) conduce a *Q* a su umbral. Aquí se genera un nuevo potencial de acción que (d) produce que el punto *R* genere otro potencial de acción y (**e**) así sucesivamente hasta el punto *S*. Un impulso nervioso consiste en una onda de eventos de despolarización-repolarización que se propaga, de nodo a nodo, a lo largo del axón.

Transmisión sináptica

Las células nerviosas se comunican entre ellas, además de con glándulas y músculos, a través de las sinapsis. Existen dos tipos de sinapsis diferentes estructuralmente, las sinapsis eléctricas y químicas. En una **sinapsis eléctrica**, el axón de una neurona llamada **neurona presináptica**, está conectado con la dendrita de otra célula, la **neurona postsináptica**, a través de uniones tipo GAP (*véase* Figura 13.18; encontraremos uniones tipo GAP con mayor detalle en el Capítulo 17). A medida que los iones se mueven entre las dos células en un sentido o en el contrario, la despolarización de la célula se transmite pasivamente a la célula a la que está conectada. Las sinapsis eléctricas confieren transmisión prácticamente sin retrasos y se producen en lugares de sistema nervioso en los que la velocidad la transmisión de información es crítica.

En una sinapsis química, las neuronas presináptica y postsináptica están próximas entre ellas, pero no conectadas directamente (Figura 13.19). Generalmente, la membrana presináptica está separada de la membrana postsináptica por un espacio de entre 20-50 nm, conocido como la **brecha o hendidura sináptica**. Una señal nerviosa que llega a los terminales de una neurona presináptica no puede saltar la hendidura sináptica en forma de impulso eléctrico. Para que se produzca la transmisión sináptica, la señal eléctrica debe ser convertida en la célula presináptica a una señal química portada por un neurotransmisor. Las moléculas de neurotransmisor se almacenan en los **botones terminales** de la neurona presináptica. Un potencial de acción que llega al terminal, produce la secreción de neurotransmisor y su difusión a través de la hendidura sináptica. Las moléculas de neurotransmisor se unen entonces a proteínas específicas embebidas en la membrana plasmática de la neurona postsináptica y se convierten de nuevo en señales eléctricas, desencadenando una secuencia de eventos que bien estimula o inhibe la producción de un potencial de acción en la neurona postsináptica, dependiendo del tipo de sinapsis.

Los neurotransmisores transmiten las señales a través de las sinapsis

Un **neurotransmisor** es una pequeña molécula cuya función es la de unirse a alguna proteína, llamada receptor, de la superficie celular en la membrana de una neurona postsináptica. Muchos tipos de moléculas actúan como neurotransmisores, cada una de ellas es con al menos un tipo específico de receptor; algunos neurotransmisores tienen más de un tipo de receptor. Cuando una molécula de neurotransmisor se une a su receptor, las propiedades del receptor se alteran y la neurona postsináptica responde adecuadamente. Podemos comparar los receptores y los neurotransmisores con una cerradura y su llave. El neurotransmisor, en virtud de su estructura química específica, es la llave que encaja en la cerradura receptora. Su función generalmente es transformar el receptor desde un estado apagado «off» a un estado encendido «on». Sin embargo, para un receptor en particular, el significado específico «off» y «on» radica en las propiedades de ese receptor. Un *neurotransmisor excitador* produce la despolarización de la

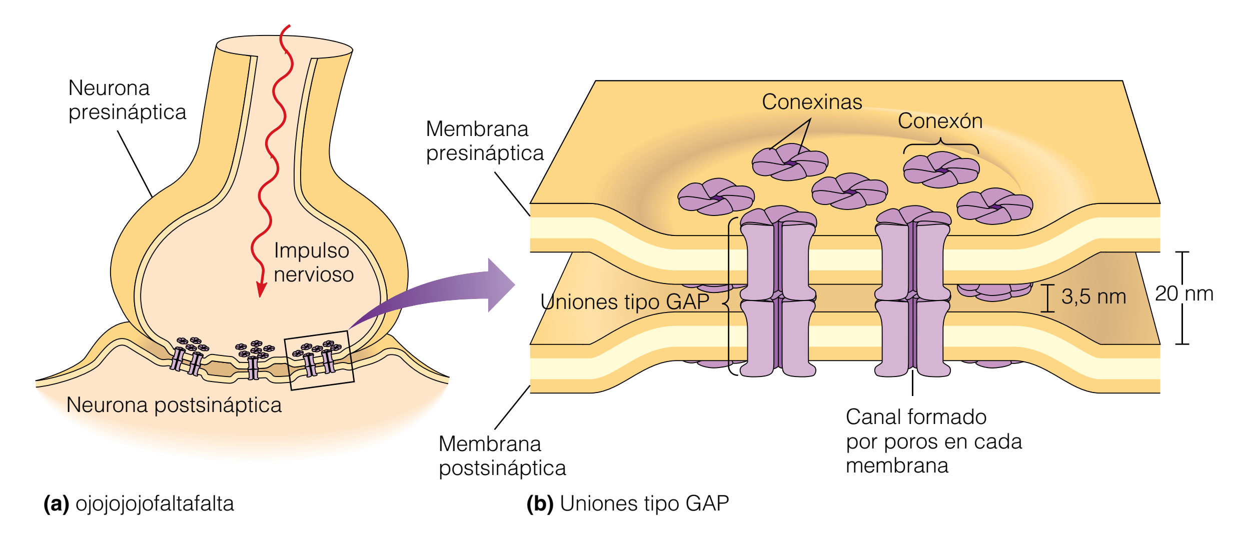


Figura 13.18 Sinapsis eléctrica. (**a**) Las neuronas presináptica y postsináptica están acopladas a través de uniones tipo GAP. Las uniones tipo GAP permiten el paso libre de pequeñas moléculas e iones, desde el citosol de una célula a la siguiente. Por lo tanto, cuando llega un potencial de acción al lado presináptico de una sinapsis eléctrica, la despolarización difunde pasivamente, debido al flujo de iones cargados positivamente, a través de la unión tipo GAP. (**b**) La unión tipo GAP está compuesta por canales. Cada canal está formado por seis subunidades proteicas denominadas conexinas. El conjunto de seis subunidades se denomina conexón. Las uniones tipo GAP están compuestas por dos conexones, uno en la membrana presináptica y otro en la membrana postsináptica.

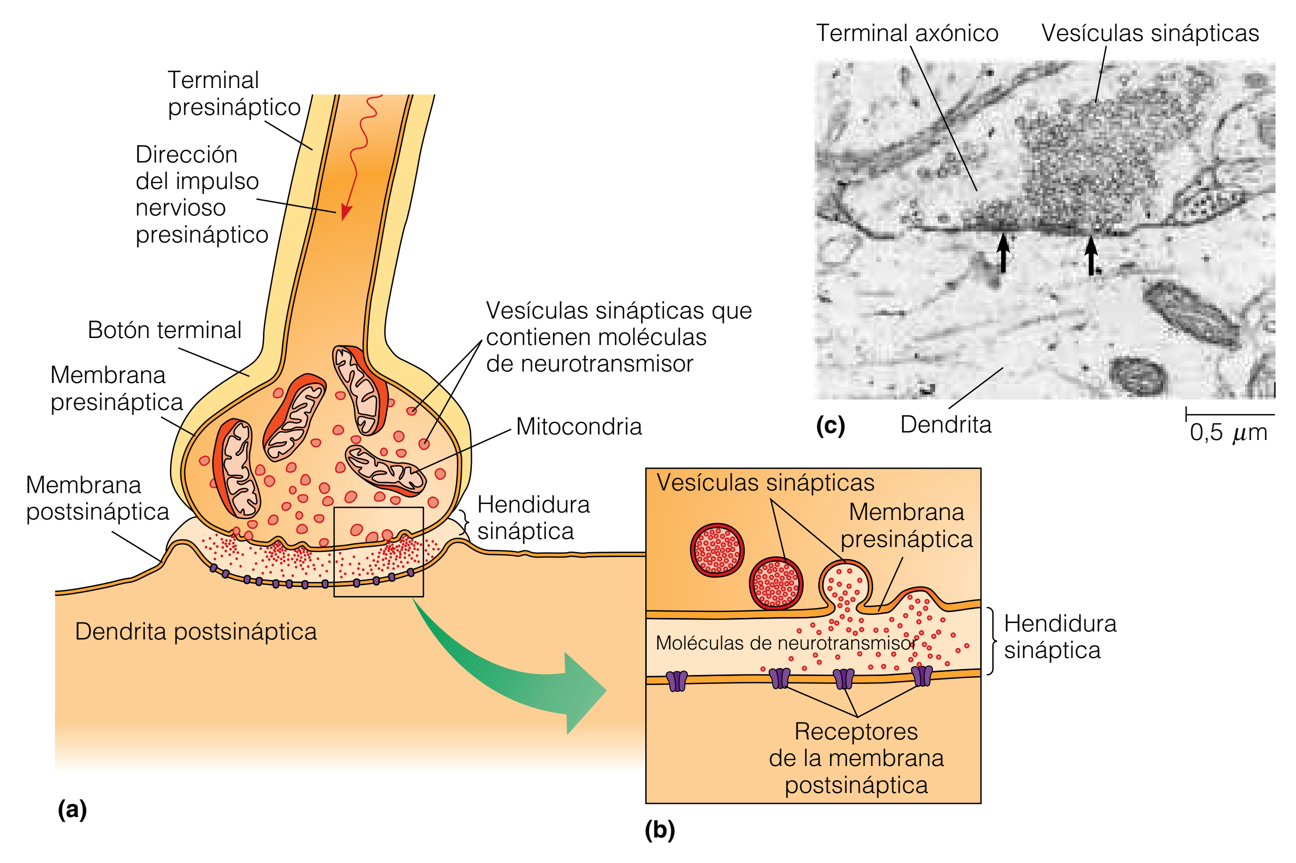


Figura 13.19 Sinapsis química. (**a**) Cuando un impulso nervioso del axón presináptico llega a la sinapsis (flecha roja), causa la fusión de las vesículas sinápticas, que contienen neurotransmisor, con la membrana presináptica del terminal axónico, liberando su contenido en la brecha sináptica. (**b**) Las moléculas de neurotransmisor difunden a través de la hendidura, desde la membrana presináptica (axonal) a la membrana postsináptica (dendrítica), donde se unen a receptores de membrana específicos y cambian la polarización de la membrana, excitando o bien inhibiendo a la célula postsináptica. (**c**) Micrografía electrónica de una sinapsis química (TEM). Las flechas indican la densidad postsináptica, donde se agrupan los receptores de membrana y otras proteínas.

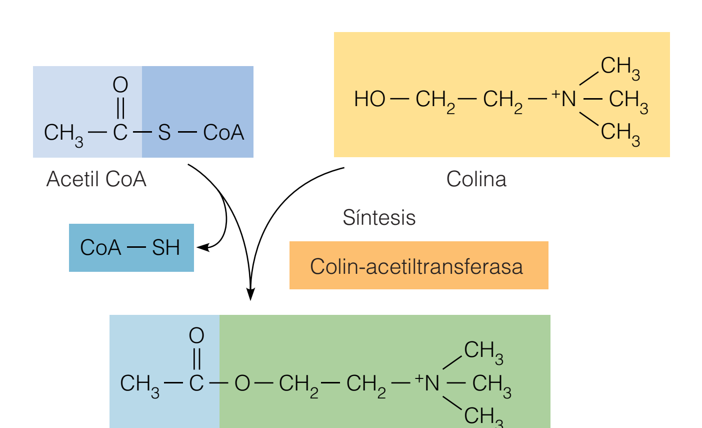
neurona postsináptica, mientras que un *neurotransmisor inhibidor* normalmente hace que la célula postsináptica se hiperpolarize.

Para ser considerado un neurotransmisor, un compuesto debe satisfacer los siguientes tres criterios: (1) debe desencadenar la respuesta adecuada cuando se introduce en hendidura sináptica, (2) debe estar presente en la neurona presináptica de manera natural, y (3) debe ser liberado en el momento preciso cuando la neurona presináptica es estimulada. Hasta el momento, las moléculas conocidas que reúnen esos criterios incluyen a la acetilcolina, a un grupo de amigas biógenas llamadas catecolaminas, algunos aminoácidos y sus derivados y algunos neuropéptidos (*véase* más adelante). La Figura 13.20 muestra numerosos neurotransmisores comunes; discutiremos algunos de ellos a continuación

Acetilcolina. En invertebrados, la **acetilcolina** (Figura 13.20) es el neurotransmisor más común para la sinapsis entre neuronas fuera del sistema nervioso central, así como en las uniones neuromusculares (*véase* Capítulo 16). La acetilcolina es un neurotransmisor excitador. Bernard Katz y sus colaboradores fueron los primeros en realizar la importante observación de que la acetilcolina incrementa la permeabilidad de la membrana postsináptica al sodio, 0,1 ms después de su unión a su receptor. Las sinapsis que usan acetilcolina como neurotransmisor se denominan **sinapsis colinérgicas**.

Catecolaminas. Las **catecolaminas** incluyen a la *dopamina*, y a las hormonas *noradrenalina y adrenalina*, todos ellos derivados del aminoácido tirosina (Figura 13.20b). Debido a que las catecolaminas se sintetizan también en la glándula suprarrenal, la sinapsis que usan estos neurotransmisores se denominan también **sinapsis adrenérgicas**. Las sinapsis adrenérgicas se encuentran en las uniones entre los nervios y el músculo liso en órganos internos como el intestino, así como en uniones entre neuronas en el cerebro. El modo de acción de las hormonas adrenérgicas se considerará en el Capítulo 14.

Otros aminoácidos y derivados. Otros neurotransmisores, formados por aminoácidos o algunos derivados de aminoácidos incluyen a la *histamina*, *serotonina* y al *ácido γ-aminobutírico (GABA)* (Figura 13.20), así como de la *glicina* y el *glutamato*. La serotonina desempeña sus funciones en el sistema nervioso central. Se considera un neurotransmisor excitador ya que produce el cierre indirecto de canales de potasio, lo cual tiene un efecto similar a la apertura de canales de sodio, que consiste en la despolarización de la



Dopamina
Noradrenalina
Adrenalina
(b) Catecolaminas

Histamina
Serotonina
Ácido γ-aminobutírico (GABA)
(c) Derivados de aminoácidos

Figura 13.20 Estructura y síntesis de neurotransmisores. (**a**) La acetilcolina es sintetizada a partir de acetil-CoA y colina por la colin-acetiltransferasa. (**b**) Las catecolaminas dopamina, noradrenalina y adrenalina se sintetizan a partir del aminoácido tirosina. La dopamina se puede convertir en noradrenalina, y la noradrenalina en adrenalina, como indican las flechas. (**c**) La histamina, la serotonina y el ácido γ-aminobutírico (GABA) son otros derivados de aminoácidos. Los aminoácidos glicina y glutamato (no se muestran) son también neurotransmisores.

célula postsináptica. Sin embargo, su efecto se produce mucho más lentamente que el de los canales de sodio. GABA y glicina son neurotransmisores inhibidores mientras que el glutamato tiene efectos excitadores.

Neuropéptidos. Los **neuropéptidos** son cadenas cortas de aminoácidos formados por la hidrólisis proteolítica de proteínas precursoras. Hasta el momento se han identificado más de 50 neuropéptidos diferentes. Algunos neuropéptidos tienen características similares a los neurotransmisores, ya que éstos excitan, inhiben o modifican la actividad de otras neuronas en el cerebro. Sin embargo, son diferentes a los neurotransmisores ya que actúan sobre grupos de neuronas y tienen efectos duraderos.

Entre los ejemplos de neuropéptidos se incluyen las *encefalinas*, que se producen de manera natural en el cerebro de mamíferos y que inhiben la actividad de neuronas de regiones del cerebro implicadas en la percepción del dolor. La modificación de la actividad neuronal por estos neuropéptidos parece ser responsable de la insensibilidad al dolor que experimentan los individuos bajo condiciones de estrés intenso o de sock. La efectividad analgésica (eliminación del dolor) de algunas drogas y medicamentos como la morfina, codeína, demerol y heroína deriva de su capacidad de unirse a los mismos sitios en el cerebro a los que normalmente se unen las encefalinas.

Niveles elevados de calcio estimulan la secreción de neurotransmisores desde las neuronas presinápticas

La secreción de neurotransmisores por la célula presináptica está controlado directamente por la concentración de iones calcio en los botones terminales (Figura 13.21). Cada vez que llega un potencial de acción, la despolarización causa un incremento temporal en la concentración de calcio en el botón terminal debido a la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje. Normalmente, la célula es relativamente impermeable a iones calcio, de manera que la concentración de calcio en el citosol permanece baja (alrededor de 10^{-4} mM). Sin embargo, existe un gradiente de concentración de calcio elevado a través de la membrana, ya que la concentración de calcio fuera de la célula es 10.000 veces más alta que la concentración en el citosol. Como resultado, los iones calcio entran rápidamente en la célula cuando los canales de calcio se abren.

Antes de su liberación, las moléculas de neurotransmisor se almacenan en pequeñas **vesículas de neurosecreción** rodeadas por membrana en los botones terminales (*véase* Figura 13.21). El incremento de calcio en el botón terminal tiene dos efectos principales sobre las vesículas de neurosecreción. En primer lugar, las vesículas almacenadas se movilizan para su rápida liberación. Para cualquier potencial de acción, únicamente liberan su contenido una fracción diminuta del número total de vesículas almacenadas en el terminal. Las neuronas mantienen las vesículas en

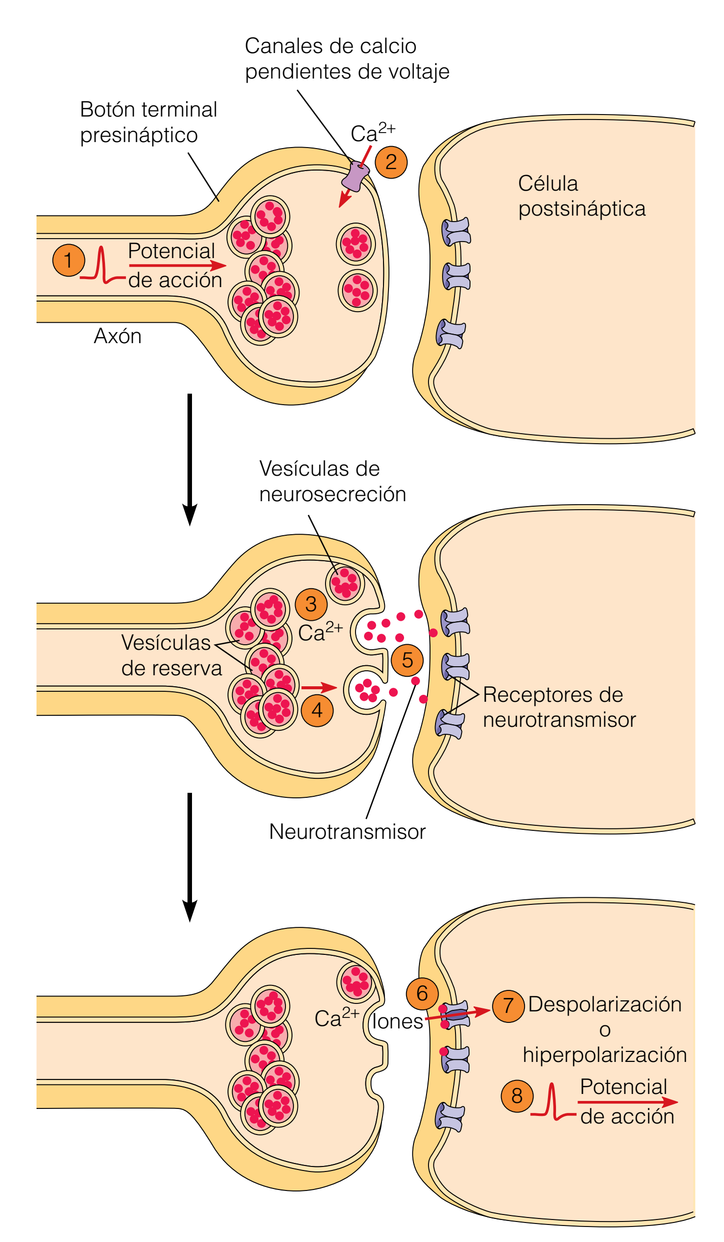


Figura 13.21 Transmisión de una señal a través de una sinapsis. ① Un potencial de acción llega a un terminal presináptico causando una despolarización transitoria. ② La despolarización abre canales de calcio dependientes de voltaje, permitiendo la entrada de calcio en el terminal. ③ Este incremento en la concentración de calcio en el terminal induce en la secreción de una fracción de las vesículas de neurosecreción. ④ El calcio también causa la liberación de vesículas de reserva del citoesqueleto de actina haciendo que estén disponibles para su secreción. ⑤ Las moléculas de neurotransmisor secretadas difunden a través de la hendidura sináptica hasta los receptores de la célula postsináptica. ⑥ La unión del neurotransmisor a su receptor altera las propiedades del receptor. ⑦ Los receptores, que son canales dependientes de ligando, se abren permitiendo el flujo de iones a la célula postsináptica. Dependiendo del ion, la apertura del canal conduce a la despolarización o a la hiperpolarización de la membrana de la célula postsináptica. ⑧ Si se produce despolarización, una cantidad suficiente de neurotransmisor excitador producirá un potencial de acción en la célula postsináptica.

reserva mediante su unión a citoesqueleto, de forma que no se pueden acercar a la membrana sináptica para su secreción.

El segundo efecto sensible al calcio en la liberación de neurotransmisor es el acercamiento y anclaje de las vesículas de neurosecreción con la membrana plasmática del botón terminal. Durante este proceso, la membrana de las vesículas se desplaza para contactar con la membrana plasmática del terminal axónico, y se funde con ella para liberar el contenido la vesícula. A continuación examinaremos este proceso con mayor detalle.

La secreción de neurotransmisor requiere el anclaje y fusión de las vesículas con la membrana plasmática

Para que un neurotransmisor actúe sobre una célula postsináptica, debe ser secretado mediante un proceso de exocitosis (*véase* Capítulo 12 para detalles sobre la exocitosis). El principal evento en la secreción es la fusión de las vesículas de neurosecreción con la membrana plasmática, lo que produce la descarga del contenido de las vesículas en la hendidura sináptica. El proceso requiere ATP y se lleva cabo a través de distintos pasos, uno de los cuales es dependiente de calcio.

Cuando un potencial de acción llega a un terminal axónico y produce la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje, entra calcio en el botón terminal. Para que las vesículas de neurotransmisor estén disponibles para la secreción, se deben liberar previamente de citoesqueleto. Este proceso es estimulado por la entrada de calcio, e implica la adición de grupos fosfato a la *sinapsina*, una proteína integral de membrana presente en la membrana de las vesículas neurosecretoras. Cuando está fosforilada, la sinapsina no permanece unida al citoesqueleto, liberando las vesículas de forma que dan comienzo el siguiente paso para la liberación del neurotransmisor.

Una vez que las vesículas son liberadas de citoesqueleto, están preparadas para fusionarse con una plasmática. Estas vesículas se agrupan cerca, pero no están en contacto con la membrana plasmática (Figura 13.22). Las vesículas liberadas deben ser preparadas o activadas antes de que se puedan fusionar con la membrana plasmática. Una vez que se han activado, las vesículas liberadas son ahora capaces de anclarse y fusionarse con la membrana de la neurona presináptica en respuesta al incremento de calcio. El anclaje tiene lugar en una zona especializada, llamada la **zona activa** dentro de la membrana de la neurona presináptica. La zona activa es una estructura altamente organizada.

Las vesículas sinápticas, las proteínas a las que se unen las vesículas y los canales de calcio que producen su liberación están agrupados en filas ordenadas, dispuestas para la secreción (Figura 13.22). La estrecha proximidad de los canales de calcio a las vesículas ayuda a explicar la extremadamente rápida fusión de la población de vesículas activadas y susceptibles de ser liberadas con la membrana plasmática neuronal, cuando la neurona es estimulada.

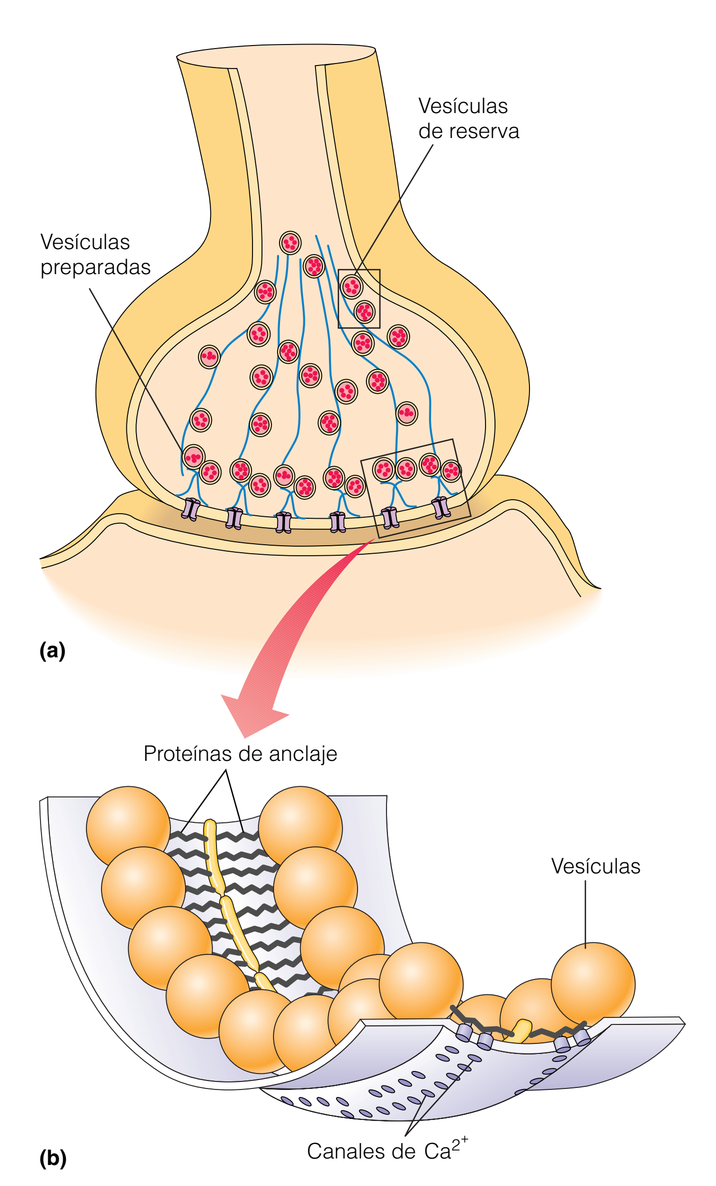


Figura 13.22 Anclaje de vesículas sinápticas con la membrana de la neurona presináptica. (**a**) En respuesta a la elevación local de calcio en la neurona presináptica, las vesículas sinápticas se liberan del citoesqueleto, permitiendo su fusión con la membrana plasmática del botón terminal en la zona activa. Las vesículas unidas al citoesqueleto a través de la sinapsina constituyen un conjunto de vesículas de reserva. Una vez que se liberan del citoesqueleto, las vesículas se desplazan a la proximidad de la membrana plasmática y se transforman en vesículas «preparadas o activadas». Algunas vesículas se asocian estrechamente con la membrana plasmática «anclaje». Cuando los canales de calcio cercanos se abren, estas vesículas ancladas se fusionan con la membrana plasmática, liberando su contenido. (**b**) Esquema basado en una reconstrucción TEM de la zona activa de una neurona motora de una rana. Las vesículas ancladas están dispuestas en filas y conectadas por un complejo de proteínas relacionadas con el anclaje. Los canales de calcio se disponen inmediatamente por debajo de las vesículas.

El anclaje y la fusión de las vesículas de neurosecreción están mediados por proteínas de anclaje dentro de la vesícula y dentro de la membrana plasmática de la zona activa. En la membrana de la vesícula, *sinaptotagmina*, *sinaptobrevina* y otras proteínas se anclan a proteínas como la *sintaxina* de la zona activa de la membrana plasmática (*véase* Figura 13.22; los mecanismos específicos implicados en los pasos de anclaje de la exocitosis se discutieron con mayor detalle en el Capítulo 12). Una vez que se produce el anclaje inicial algunas proteínas adicionales del citosol estabilizan la unión, formando un complejo de anclaje multiproteico. La fusión depende del éxito del anclaje de las vesículas a la zona activa y de la formación del complejo de anclaje completo.

Dos enfermedades familiares y potencialmente letales se producen al interferir con los procesos de anclaje que acabamos de describir. Tanto el tétano como botulismo, se producen por la interferencia de **neurotoxinas** con el anclaje y la liberación de las vesículas. La *toxina tetánica* evita la liberación de neurotransmisor de neuronas inhibidoras en la médula espinal, produciendo la contracción muscular incontrolada (por lo que el tétano se ha denominado coloquialmente como trismo). La *toxina botulínica* evita la liberación de neurotransmisor de las neuronas motoras y produce debilidad muscular y parálisis.

Los neurotransmisores son detectados por receptores específicos en las neuronas postsinápticas

Los receptores de neurotransmisores se clasifican en dos grandes grupos: canales iónicos dependientes de ligando, en los que la activación tiene un efecto directo en la célula, y receptores que producen sus efectos indirectamente a través del sistema de mensajeros intracelulares. Discutiremos la segunda categoría de receptores en el Capítulo 14; aquí nos centraremos en los canales dependientes de ligando. Estos canales iónicos de membrana se abren como respuesta a la unión de un neurotransmisor y pueden mediar respuestas tanto excitadoras como inhibidoras en la célula postsináptica.

El receptor de acetilcolina. La acetilcolina se une a un canal de sodio dependiente de ligando, más conocido como *receptor de acetilcolina*. Cuando se unen dos moléculas de acetilcolina, el canal se abre y permite la entrada de sodio en la neurona postsináptica, produciendo una despolarización.

Nuestra comprensión de la transmisión sináptica se ha visto ayudada en gran medida por la facilidad con la que se pueden aislar membranas ricas en receptores de acetilcolina a partir de los órganos eléctricos de la raya (*Torpedo californica*). Los órganos eléctricos están formados por electroplacas —hacinamientos de células que están inervadas por una cara pero no por la otra—. La cara inervada de esta agrupación puede sufrir un cambio de potencial de −90 mV hasta 60 mV mediante su excitación, mientras que en cara no inervada permanece a −90 mV. Por lo tanto, en el pico de un potencial de acción se puede generar una diferencia de potencial de 150 mV a través de una única electroplaca. Debido a que el órgano eléctrico contiene miles de electroplacas organizadas en serie, sus voltajes son aditivos, permitiendo a la raya liberar descargas de varios cientos de voltios.

Cuando las membranas del electroplaca se examinan con el microscopio electrónico, se observa que son ricas en partículas arrosariadas de alrededor de 800 nm de diámetro (Figura 13.23a). Cada partícula está formada por cinco subunidades organizadas en torno a un eje central; su tamaño y sus reacciones con anticuerpos indican que estas partículas son los receptores de acetilcolina.

La purificación bioquímica del receptor de acetilcolina se ha visto favorecida enormemente por la disponibilidad de distintas sustancias del veneno de serpiente, incluyendo la *α-bungarotoxina* y la *cobratoxina*. Estas neurotoxinas sirven para la función altamente específica de localizar y cuantificar los receptores de acetilcolina, ya que se pueden marcar radiactivamente y posteriormente unir al receptor firmemente y con una gran especificidad. Otras neurotoxinas actúan sobre canales iónicos como los canales de calcio (Anexo 13A).

El receptor de acetilcolina purificado tiene un peso molecular de alrededor de 300.000 y está formado por cuatro tipos de subunidades —α, β, γ y δ— cada una formada por alrededor de 500 aminoácidos (Figura 13.23b y c). Los receptores de acetilcolina desempeñan un papel fundamental en la transmisión de impulsos nerviosos a la musculatura (*véase* el Anexo 13A para mayor información). En algunos casos, los pacientes humanos desarrollan respuestas autoinmunes hacia sus propios receptores de acetilcolina (en otras palabras, su sistema inmune ataca sus propios receptores como si fuesen invasores extraños). Cuando esto sucede, los pacientes pueden desarrollar una patología conocida como *myastemia gravis*, en la que se produce una debilidad muscular degenerativa.

Receptor de GABA. El receptor de ácido γ-aminobutírico (GABA) es también un canal dependiente de ligando, pero cuando se abre, deja pasar iones cloro en lugar de iones sodio. Debido a que los iones cloro se encuentran normalmente en una concentración más alta en el medio que rodea a la neurona (*véase* Tabla 13.1), la apertura de los receptores de GABA produce una entrada de cloro en la célula postsináptica. El principal efecto de la entrada de cloro es la inhibición de la despolarización de las neuronas postsinápticas. Para comprender cómo el receptor de GABA consigue este efecto, recuerde que los iones sodio despolarizan la membrana cuando entran en la célula sin la compañía de un ion cargado negativamente. Sin embargo, si entra un ion cloro al mismo tiempo que el ion sodio, no se produce un efecto neto del potencial de membrana. Mediante la apertura de los canales de cloro, el receptor activado de GABA ayuda a neutralizar los efectos de la entrada de sodio en el potencial de membrana, reduciendo por lo

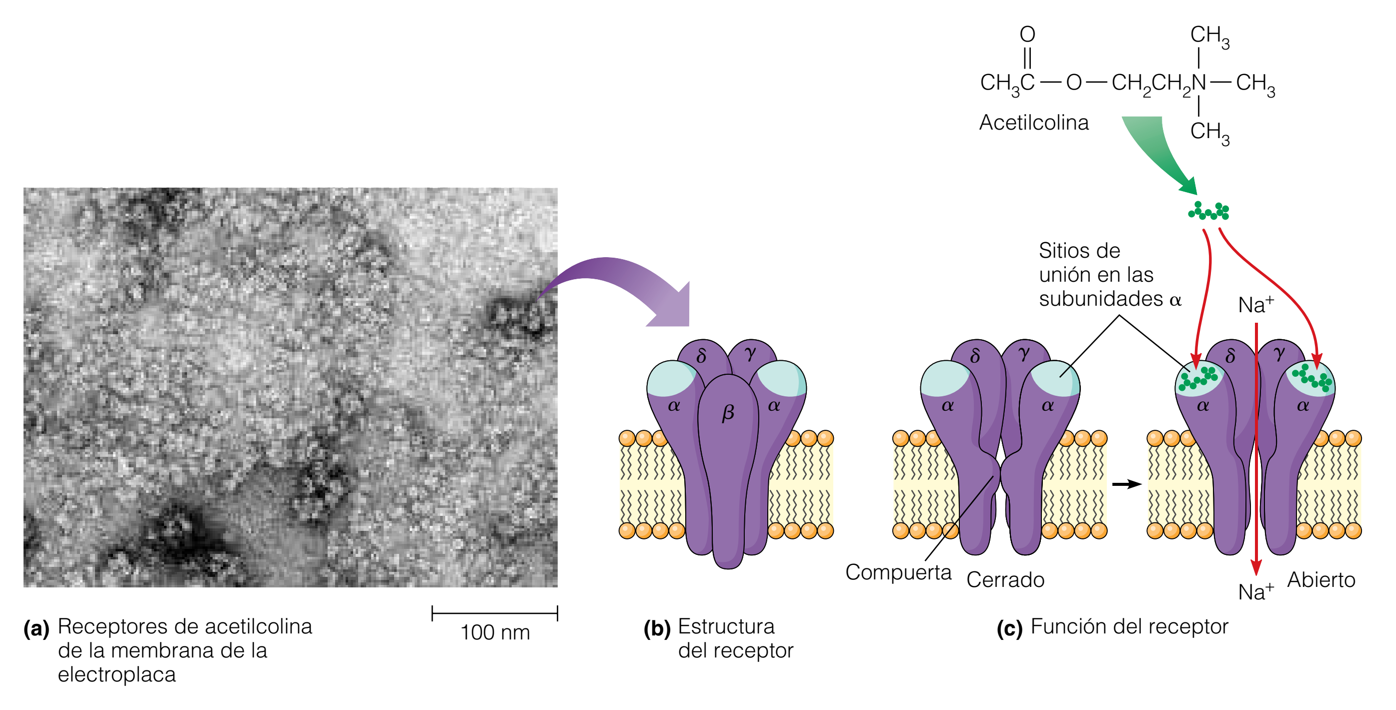


Figura 13.23 Receptor de acetilcolina. El receptor de acetilcolina es el principal receptor excitador del sistema nervioso central. (**a**) Esta micrografía de TEM de una membrana postsináptica muestra las partículas arrosariadas, consideradas como los receptores de acetilcolina, de la membrana de la electroplaca. (**b**) Este receptor contiene cinco subunidades, incluyendo dos subunidades α con los sitios de unión para la acetilcolina, y una subunidad β, γ y δ. Las subunidades se agregan en la bicapa lipídica de forma que las porciones transmembrana forman un canal. (**c**) El canal (representado aquí sin la subunidad β) está normalmente cerrado, pero cuando se une acetilcolina a los dos sitios de las subunidades α, la subunidades se modifican de forma que canal se abre y permite la entrada de los iones sodio.

tanto la cantidad de despolarización que se produce y disminuyendo la probabilidad de que se inicie un potencial de acción en la neurona postsináptica. Las benzodiacepinas, como el Valium y el Librium, pueden incrementar los efectos de GABA sobre su receptor. Presumiblemente esto produce el efecto tranquilizante de estos medicamentos.

Los neurotransmisores deben ser inactivados poco después de su liberación

Para que las neuronas transmitan señales de manera efectiva, resulta tan importante detener un estímulo como generarlo. Independientemente de que sea excitador un inhibidor, una vez que se ha secretado un neurotransmisor, éste debe ser retirado rápidamente de la hendidura sináptica. Si esto no se produce, la excitación o la inhibición de la neurona postsináptica podría ser prolongada anormalmente, incluso en ausencia de nuevas señales de las neuronas presinápticas. De hecho, la persistencia de un neurotransmisor excitador como la acetilcolina produce que los músculos no sean capaces de relajarse, conduciendo finalmente a la muerte.

Los neurotransmisores son retirados de la hendidura sináptica por dos mecanismos específicos: degradación a moléculas inactivas o recaptación por el terminal presináptico. La acetilcolina supone un ejemplo del primer mecanismo. La enzima *acetilcolinesterasa* hidroliza a la acetilcolina en ácido acético (o ion acetato) y colina, ninguno de los cuales estimula al receptor de acetilcolina. La recaptación es un método mucho más común para detener la transmisión sináptica. Proteínas transportadoras específicas en la membrana del terminal presináptico bombean el neurotransmisor de vuelta a los terminales axónicos presinápticos. El ritmo de recaptación de neurotransmisor puede ser muy rápido; para algunas neuronas, la sinapsis debe ser limpiada de neurotransmisor dentro de un periodo tan breve como 1 milisegundo. Ya que el neurotransmisor recaptado puede ser reciclado y utilizado de nuevo, la neurona presináptica debe sintetizar una menor cantidad de neurotransmisor nuevo. La recaptación se realiza por endocitosis. Algunos medicamentos antidepresivos actúan bloqueando la recaptación de neurotransmisores específicos. Por ejemplo, el Prozac bloquea la recaptación de serotonina, conduciendo al incremento local en el nivel de serotonina disponible para las neuronas postsinápticas.

Integración y procesamiento de señales nerviosas

La transmisión de señales a través de la sinapsis no genera potenciales de acción en la célula postsináptica automática-

Anexo 13A **Aplicaciones humanas**

Flechas envenenadas, mordeduras de serpientes y gases nerviosos

Debido a que el funcionamiento coherente del cuerpo humano depende críticamente del sistema nervioso, cualquier factor que interrumpa la transmisión de los impulsos nerviosos es probablemente muy peligroso. Debido a la importancia de la acetilcolina como neurotransmisor, cualquier sustrato que interfiera con su función es, muy probablemente, letal. Se conocen varias toxinas que interrumpen la función nerviosa y muscular mediante efectos específicos en las sinapsis colinérgicas. Consideraremos algunas de esas sustancias, no sólo para subrayar el serio peligro que suponen para la salud humana, sino también para ilustrar con qué claridad se pueden explicar su modo de acción una vez que se comprende la fisiología de la transmisión sináptica.

Una vez que se ha liberado acetilcolina en la hendidura sináptica y ha ocurrido la despolarización de la membrana o postsináptica, el exceso de acetilcolina debe ser hidrolizado rápidamente. De lo contrario, la membrana no puede volver a su estado polarizado y posteriormente no será posible la transmisión.

La enzima acetilcolinesterasa es, por tanto, esencial y las sustancias que inhiben su actividad son habitualmente muy tóxicas.

Los *ésteres de carbamoil* son una familia de inhibidores del acetilcolinesterasa. Estos compuestos inhiben la acetilcolinesterasa mediante el bloqueo covalente del sitio activo de la enzima, evitando de manera efectiva la ruptura de la acetilcolina. Un ejemplo de este tipo de inhibidor es la *fisostigmina* (algunas veces llamada también *eserina*), un alcaloide de origen vegetal.

Numerosos fosfatos sintéticos forman complejos covalentes, incluso más estables, con el sitio activo del acetilcolinesterasa y por lo tanto son inhibidores más potentes. En esta clase de compuestos se incluyen numerosos insecticidas de amplio uso como *paratión* y *malatión* y algunos gases nerviosos como *tabun* y *sarin*.

El principal efecto de estos compuestos es la parálisis muscular, causada por la incapacidad de la membrana postsináptica para volver a su estado polarizado.

La transmisión nerviosa en las sinapsis colinérgicas se puede bloquear, no sólo por inhibidores del acetilcolinesterasa, sino también por sustancias que compiten con la acetilcolina en su unión al receptor de la membrana postsináptica. Un ejemplo notorio de ese tipo de venenos es el *curare*, un extracto vegetal empleado por los nativos suramericanos para envenenar flechas. Uno de los factores activos en el curare es la *d-tubocurarina*. Los venenos de serpientes actúan de la misma forma. Tanto la *α-bungarotoxina* (de serpientes del género *Bungarus*) como la *cobratoxina* (de las cobras) son pequeñas proteínas básicas que se unen covalentemente al receptor de acetilcolina y de esta forma bloquean la despolarización de la membrana postsináptica.

Las sustancias que funcionan de este modo se denominan *antagonistas* de los sistemas colinérgicos. Otros compuestos llamados *agonistas* tienen el efecto contrario. Los agonistas se unen al receptor de acetilcolina, pero al hacerlo emulan a la acetilcolina, produciendo la despolarización de la membrana postsináptica. Sin embargo, al contrario que la acetilcolina no pueden ser inactivados rápidamente, de forma que la membrana no vuelve a su estado polarizado.

Aunque con orígenes y usos diversos, las flechas envenenadas, los venenos de serpiente, los gases tóxicos y los relajantes musculares quirúrgicos tienen algunas características en común. Cada uno interfiere de una manera con el funcionamiento normal de la acetilcolina, y cada uno es, por lo tanto, una neurotoxina, ya que interrumpe la transmisión de impulsos nerviosos, teniendo potencialmente consecuencias letales. Cada uno de ellos ha resultado ser también útil como herramienta para la investigación, lo que ilustra de nuevo el extraño aunque poderoso arsenal de herramientas exóticas con el que los biólogos y los bioquímicos son capaces de plantear sus experimentos para examinar la complejidad de la función celular.

mente. No existe necesariamente una relación uno a uno entre la llegada de un potencial de acción a la neurona presináptica y la iniciación de otro en la neurona postsináptica. Un potencial de acción único puede producir la secreción de suficiente neurotransmisor para producir una despolarización detectable en la neurona postsináptica, pero habitualmente no suficiente para producir la generación de un potencial de acción en la célula postsináptica. Estos pequeños incrementos en el potencial debidos a la unión del neurotransmisor se denominan potenciales postsinápticos (PSPs). Si un neurotransmisor es excitador, generará una pequeña cantidad de despolarización conocida como **potencial excitador postsináptico (EPSP)**. De la misma manera, si el neurotransmisor es inhibidor, producirá una pequeña hiperpolarización en la neurona postsináptica; esto se denomina un **potencial inhibidor postsináptico (IPSP).**

Para que una neurona presináptica estimule la generación de un potencial de acción en la neurona postsináptica, se debe generar un EPSP hasta el punto en el que la membrana postsináptica alcanza el potencial umbral. Los EPSPs pueden hacer esto de dos maneras diferentes que examinaremos a continuación.

Las neuronas pueden integrar señales procedentes de otras neuronas mediante sumación temporal y espacial

Un potencial de acción individual producirá únicamente un EPSP transitorio. Sin embargo, si se suceden dos potenciales de acción de manera rápida en la neurona presináptica, la neurona postsináptica no tendrá tiempo para reponerse del primer EPSP antes de experimentar el segundo EPSP. El resultado es que la neurona postsináptica se despolarizará más. Una secuencia rápida de potenciales de acción suma de manera efectiva los EPSPs en el tiempo y conduce a la neurona postsináptica a su umbral. Esto se denomina *sumación temporal*.

La cantidad de neurotransmisor liberado en una única sinapsis después de un potencial de acción normalmente no es suficiente para producir un potencial de acción en la célula postsináptica. Cuando muchos potenciales de acción producen la liberación de neurotransmisor simultáneamente, sus efectos se combinan; algunas veces esto produce una intensa despolarización de la célula postsináptica. Esto se conoce como *sumación espacial*, ya que la neurona postsináptica integra las numerosas pequeñas despolarizaciones que ocurren sobre su superficie para generar una despolarización mayor.

Las neuronas pueden integrar señales excitadoras e inhibidoras procedentes de otras neuronas

Además de recibir estímulos con una intensidad variable, las neuronas postsinápticas pueden recibir información de distintos tipos de neuronas. Todas estas sinapsis no tienen necesariamente que usar el mismo neurotransmisor. Además, una neurona postsináptica puede recibir sinapsis tanto de neuronas excitadoras como inhibidoras. Las neuronas pueden recibir literalmente miles de impulsos sinápticos de otras neuronas. Cuando estas distintas neuronas descargan al mismo tiempo producen efectos combinados en el potencial de membrana de la neurona postsináptica (Figura 13.24). Así, por la suma física de los EPSPs e IPSPs, una neurona individual integra de manera efectiva las señales entrantes (excitadoras o inhibidoras). Todavía existe otro nivel de complejidad que implica los cambios a largo plazo en las conexiones sinápticas entre neuronas que están implicadas en procesos tan complejos como el aprendizaje y la memoria. Los cambios dentro de las neuronas que permiten estos cambios a largo plazo requieren la comprensión de la transducción de señales que estudiaremos en el Capítulo 14.

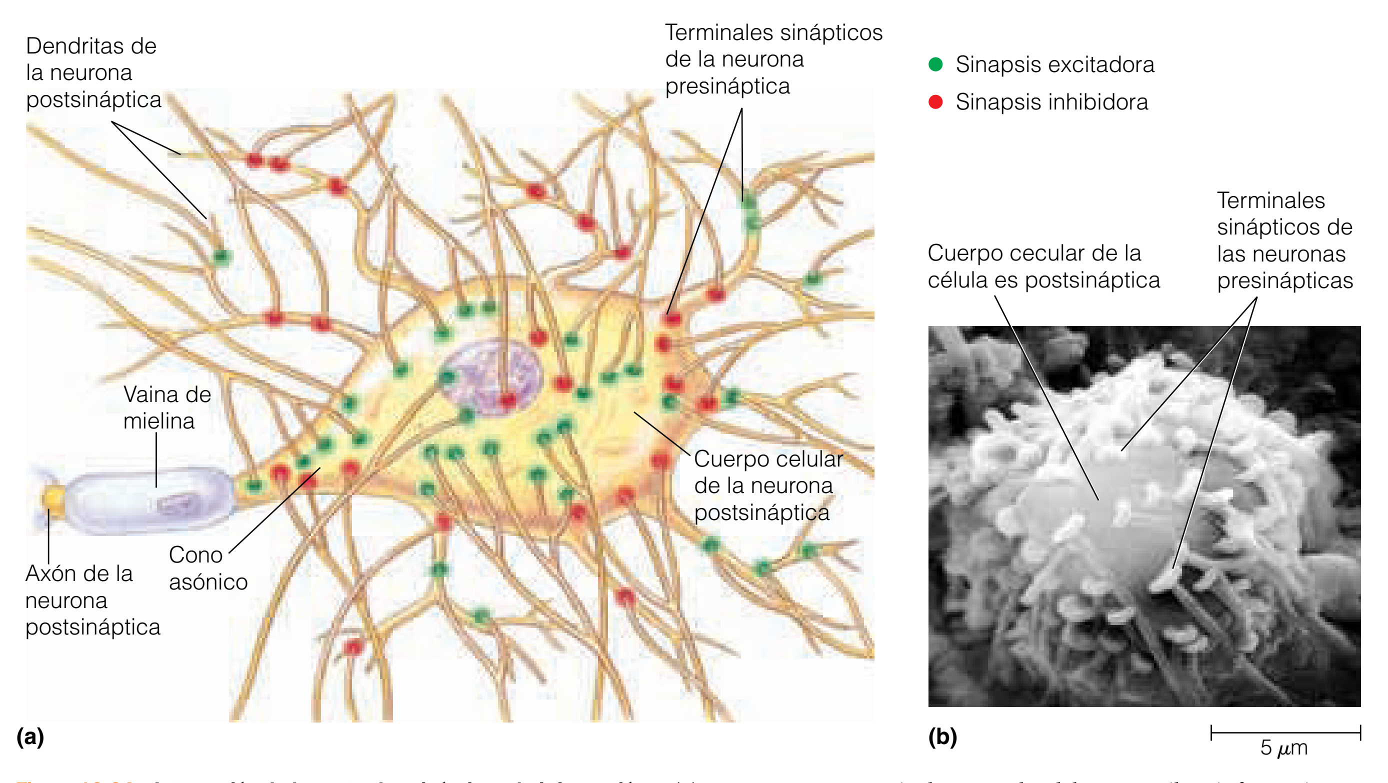


Figura 13.24 Integración de las entradas sinápticas de información. (**a**) Las neuronas, y particularmente las del CNS, reciben información a través de miles de sinapsis, algunas de las cuales son excitadoras (verde) y otras inhibidoras (rojo). En el cono axónico de una de estas neuronas se puede generar un potencial de acción, si los efectos combinados de los potenciales de membrana inducidos por las sinapsis producen una despolarización por encima del valor umbral del potencial. La sumación tanto espacial como temporal contribuye a la probabilidad de que se inicie un potencial de acción. (**b**) Esta micrografía (SEM) muestra numerosos terminales presinápticos haciendo contacto con una neurona postsináptica.

Perspectiva

Todas las células mantienen un potencial eléctrico a través de sus membranas; las neuronas, sin embargo, están especializadas para emplear los potenciales de membrana para transmitir señales de una parte de un organismo a otra. Para llevar a cabo esta función, poseen prolongaciones delgadas (dendritas y axones) que reciben impulsos o los transmiten a la siguiente célula. La membrana de un axón puede estar o no recubierta por una vaina de mielina.

Las células desarrollan un potencial de membrana debido a la separación de cargas positivas y negativas a través de la membrana. Este potencial se produce por el movimiento de los iones a favor del gradiente electroquímico, a los cuales la membrana es permeable. El potencial máximo de membrana que puede producir un gradiente iónico es el potencial equilibrio para ese ion —una condición teórica que no se alcanza en las células ya que requiere que la membrana sea únicamente permeable a ese ion—. Para calcular el potencial de membrana en reposo de una célula, se emplea la ecuación de Goldman. El potencial de reposo a la membrana plasmática de la mayoría de células animales se sitúa habitualmente en el rango de −0 a −75 mV. Estos valores están bastante próximos al potencial de equilibrio para el ion potasio, y muy alejados del potencial equilibrio para el ion sodio (alrededor de 55 mV), lo que refleja la mayor permeabilidad de la membrana en reposo para el potasio.

El potencial de acción de una neurona representa una despolarización y repolarización transitoria de su membrana debido a la apertura y cierre secuencial de canales de sodio y de potasio dependientes de voltaje. Estos canales se han caracterizado estructuralmente mediante técnicas moleculares y funcionalmente por técnicas de patch clamp. Son canales iónicos dependientes de voltaje cuya probabilidad de apertura, y consecuentemente su conductancia, dependen del potencial de membrana.

Un potencial de acción se inicia cuando una membrana es despolarizada hasta su valor umbral en el que la tasa de entrada de sodio excede la tasa máxima de salida de potasio en condiciones de reposo. La entrada de iones sodio conduce al potencial de membrana a aproximadamente 40 mV antes de que los canales de sodio dependientes de voltaje se inactiven, lo que conduce a la repolarización de la membrana, incluyendo un periodo breve de hiperpolarización. Esta secuencia de apertura y cierre de canales se produce generalmente en pocos milisegundos.

La despolarización de la membrana debido un potencial de acción se extiende por difusión pasiva a regiones adyacentes en la membrana que generan así un nuevo potencial de acción que se propaga a lo largo de la membrana, alcanzando finalmente una sinapsis entre una célula nerviosa y otras con la cual se comunica. Estas sinapsis pueden ser eléctricas o químicas. En una sinapsis eléctrica, la despolarización se transmite desde la célula presináptica a la postsináptica a través de uniones tipo GAP directas. En una sinapsis química, el impulso eléctrico incrementa la permeabilidad de la membrana del calcio. A medida que los iones calcio cruzan la membrana presináptica producen una fusión de las vesículas a esta membrana. Las vesículas sinápticas contienen moléculas de neurotransmisor, que se liberan a la hendidura sináptica mediante la fusión. Las moléculas de neurotransmisor difunden a través de la hendidura sináptica hasta la membrana postsináptica, donde se unen a receptores específicos que frecuentemente son canales iónicos dependientes de ligando.

El receptor mejor conocido es el receptor de acetilcolina que es un receptor excitador. La unión de acetilcolina estimula la apertura de este canal, permitiendo la entrada de sodio. El influjo de sodio resultante produce una despolarización local de la membrana postsináptica, que puede por lo tanto iniciar un potencial de acción en la neurona postsináptica. Después de la despolarización, la enzima acetilcolinesterasa hidroliza la acetilcolina, haciendo volver de esta forma a la sinapsis al estado reposo. Un ejemplo de receptor inhibidor es el receptor de GABA (ácido γ-aminobutírico) que es un canal de cloro dependiente de voltaje. Después de la unión de GABA este receptor permite un incremento en la entrada de cloro, que conduce a la hiperpolarización de la membrana postsináptica y a una reducción de la excitabilidad neuronal.

Los diversos neurotransmisores pueden producir específicamente tanto potenciales postsinápticos excitadores como inhibidores. Por lo tanto, la transmisión de un potencial de acción de una neurona a otra requiere que el cuerpo celular de la neurona postsináptica integre la actividad excitadora e inhibidora de miles de contactos sinápticos. Las señales que entran en la célula, pueden despolarizar el cuerpo celular a través de procesos de sumación temporal y espacial, de manera suficiente para iniciar un nuevo potencial de acción en el cono axónico.

Problemas

Los problemas de mayor dificultad están marcados con un •.

13.1 La realidad sobre las células nerviosas. Indique, si cada una de las siguientes afirmaciones es cierta o falsa para todas las células nerviosas (A), solo para algunas células nerviosas (S), o para ninguna célula nerviosa (N).

(a) Los terminales axónicos están separados en las células a las que inervan por una pequeña hendidura.

(b) El potencial de membrana en reposo de una membrana axonal es negativo.

(c) Los nodos of Ranvier se encuentran a intervalos regulares a lo largo del axón.

(d) El potencial de reposo de la membrana están mucho más próximo al potencial equilibrio de los iones potasio que al de los iones sodio, debido a que la permeabilidad de la

membrana axonal es mucho mayor para el potasio que para el sodio.

(e) La excitación de la membrana produce un incremento permanente en su permeabilidad a los iones sodio.

(f) El potencial eléctrico a través de la membrana de un axón se puede medir fácilmente empleando electrodos.

(g) La elevación de calcio estimula la liberación de vesículas de neurosecreción que contienen serotonina.

•**13.2 El potencial de membrana en reposo.** La ecuación de Goldman se emplea para calcular V_m, el potencial de reposo de una membrana biológica. Como se presenta en este capítulo, la ecuación contiene únicamente términos para iones sodio, potasio y cloro.

(a) ¿Por qué aparecen únicamente esos tres iones en la ecuación de Goldman, si ésta afecta a la transmisión de impulsos nerviosos?

(b) Sugiera una formulación más general de la ecuación de Goldman que pueda aplicarse a membranas que sean también permeables a otros iones monovalentes.

(c) ¿Cuánto podría cambiar el potencial de membrana en reposo si la permeabilidad relativa para los iones sodio fuese de 1,0 en lugar de 0,01?

(d) ¿Esperaría que fuese lineal la representación de V_m frente a la permeabilidad relativa de la membrana al sodio? ¿Por qué?

13.3 Patch clamp. Los instrumentos de match clamp posibilitan a los investigadores medir la apertura y el cierre de un único canal en la membrana. Un canal receptor típico de acetilcolina deja pasar alrededor de 5 pA (picoamperios) de corriente (1 picoamperio $= 10^{-12}$ amperios) durante un periodo de unos 5 ms a -60 mV.

(a) Ya que una corriente eléctrica de 1 A es alrededor de $6{,}2 \times 10^{18}$ cargas eléctricas por segundo, ¿cuántos iones (sodio o potasio) pasan a través del canal durante el tiempo que está abierto?

(b) ¿Considera que la apertura de un único receptor podría ser suficiente para despolarizar una membrana postsináptica? ¿Por qué?

13.4 Potencial de membrana de equilibrio. Responda a cada una de las siguientes preguntas respecto al E_{Cl}, potencial equilibrio de membrana para los iones cloro. La concentración de iones cloro dentro del axón gigante de calamar puede variar desde 50 a 150 m*M*.

(a) Antes de hacer cálculos, haga la predicción de si será positivo o negativo. Explíquelo.

(b) Calcule ahora E_{Cl} asumiendo que la concentración interna de cloro es de 50 m*M*.

(c) ¿Cuánto variaría el valor de E_{Cl} si la concentración interna de cloro fuese de 150 m*M*?

(d) ¿Por qué supone que la concentración de cloro dentro del axón es tan variable?

•**13.5 Latidos cardíacos.** La comprensión de la estimulación de las células musculares implica algunos de los mismos principios presentes en las células nerviosas, excepto el que los iones calcio tienen un papel muy importante en las células musculares. Las siguientes concentraciones iónicas son típicas del músculo cardíaco humano y del suero que baña a los músculos:

$[Ca^{2+}]$: 0,001 m*M* en la célula, 6 m*M* en el suero
$[Na^{+}]$: 10 m*M* en la célula, 145 m*M* en el suero
$[K^{+}]$: 150 m*M* en la célula, 4,6 m*M* en el suero

La Figura 13.25 muestra los cambios que se producen en el potencial de membrana durante la estimulación de una célula muscular cardíaca.

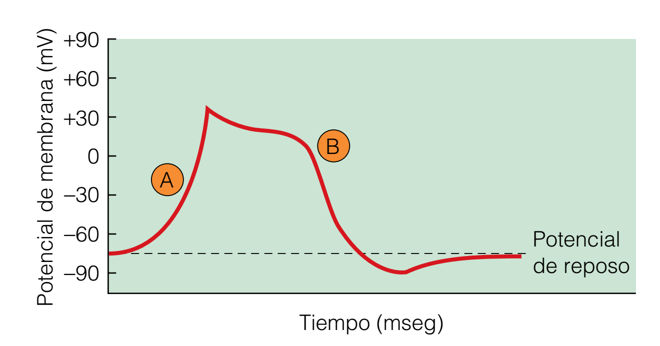


Figura 13.25 Potencial de acción de una célula muscular cardíaca humana. *Véase* el Problema 13.5.

(a) Calcule el potencial equilibrio de la membrana para cada uno de los tres iones en base a las concentraciones citadas.

(b) ¿Por qué el potencial de equilibrio de la membrana es significativamente más negativo que en el axón de calamar (-75 mV frente a -60 mV)?

(c) El incremento del potencial de membrana en la región Ⓐ de la gráfica podría ser debido teóricamente al movimiento a través de la membrana de uno o de los dos cationes. ¿Qué cationes son y en qué dirección esperaría que se moviesen a través de la membrana?

(d) ¿Cómo distinguir entre las distintas posibilidades sugeridas en el apartado c?

(e) La disminución rápida del potencial de membrana que ocurre en la región Ⓑ está producida por el movimiento de salida de los iones potasio. ¿Cuáles son las fuerzas que producen la salida del potasio de la célula en este punto? ¿Por qué no son operativas las mismas fuerzas en la región Ⓐ de la curva?

(f) Los pacientes con enfermedades cardíacas a menudo toman medicamentos que pueden doblar o triplicar los niveles de potasio en el suero, hasta alrededor de 10 m*M*, sin alterar la concentración intracelular de potasio. ¿Qué efecto tendrá este incremento en la tasa de movimiento de iones potasio alrededor de la membrana durante la estimulación de las células cardíacas? ¿Qué efecto tendrá sobre el potencial de reposo del músculo?

13.6 La respuesta a la excitación de la membrana es de tipo todo o nada. La membrana de una célula nerviosa exhibe una respuesta todo o nada frente a la estimulación; es decir, una vez que se ha superado el valor umbral, la magnitud de la respuesta es independiente de la magnitud del estímulo.

(a) Expliqué con sus propias palabras por qué se produce esto.

(b) ¿Por qué es necesario que el estímulo supere un valor umbral?

(c) Si cada neurona muestra una respuesta todo o nada, ¿cómo supone que el sistema nervioso de un animal puede distinguir entre distintas intensidades de estimulación? ¿Cómo cree que su propio sistema nervioso puede distinguir entre un hierro templado y un hierro caliente, o entre una orquesta de cámara y un grupo de rock?

13.7 Esclerosis múltiple y propagación de potenciales de acción. La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoimmune que afecta a los nervios mielinizados y degrada la vaina de mielina que los envuelve. ¿Cómo piensa que se verá afectada la propagación de los potenciales de acción en una célula nerviosa que ha sido dañada en un paciente con EM?

13.8 Propagación en una dirección. ¿Por qué los potenciales de acción se mueven únicamente en una dirección a lo largo del axón?

13.9 Neurotransmisores inhibidores. Algunos neurotransmisores inhibidores producen la apertura de canales de cloro, mientras que otros estimulan la apertura de canales de potasio. Explique por qué el incremento de la permeabilidad de la membrana neuronal tanto al cloro como al potasio harán más difícil la generación de un potencial de acción. ¿Qué generalización puede hacer sobre los neurotransmisores inhibidores?

13.10 Problemas en la sinapsis. La transmisión de un impulso nervioso a través de una sinapsis colinérgica se puede inhibir mediante diversas neurotoxinas. Indique, lo más específicamente posible, en efecto que tiene cada uno de los siguientes venenos o medicamentos en la transmisión sináptica y qué efectos tiene cada uno sobre la polarización de la membrana postsináptica (*véase* el Anexo 13A):

(a) El veneno de serpiente a bungarotoxina.

(b) El insecticida malatión.

(c) Sucinnilcolina.

(d) El éster carbamoil neoestigmina.

•**13.11 Más problemas en la sinapsis.** Los medicamentos que afectan a la recaptación de los neurotransmisores se usan generalmente para el tratamiento del trastorno de hiperactividad/déficit de atención y en la depresión clínica. Explique, en términos moleculares, qué efecto(s) tendrán estos inhibidores de la recaptación, en la neurona postsináptica, asumiendo que el neurotransmisor en cuestión es excitador para la célula postsináptica.

Bibliografía recomendada

Las referencias con importancia histórica están marcadas con •.

Referencias generales

Albright, T. D., T. M. Jessell, E. R. Kandel y M. I. Posner. Neural Science: a century of progress and the mysteries that remain. *Cell* 100 (2000): S1.

Levitan, I. B. y L. K. Kaczmarek. *The Neuron: Cell and Molecular Biology*, 3rd ed. New York: Oxford University Press, 2001.

Nicholls, J. G., A. R. Martin, B. G. Wallace y P. A. Fuchs. *From Neuron to Brain*, 4th ed. Sunderlan, MA: Sinauer, 2001.

Canales iónicos, Patch camp y excitación de la membrana

Aldrich R. W. Fifty years of inactivation. *Nature* 411 (2001): 643.

Caterall, W. A. Structure and regulation of voltage-gated Ca; channels. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 16 (2000): 521.

Choe, S. Potassium channel structures. *Nat. Rev. Neurosci.* 3 (2002): 115.

•Hodgkin, A. L. y A. F. Huxley. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117 (1952): 500.

Kaplan J. H. Biochemistry of Na, K-ATPase. *Annu. Rev. Biochem.* 71 (2002): 511.

MacKinnon R. Potassium channels. *FEBS Lett.* 555 (2003): 62.

•Neher, E. y B. Sakmann. The patch-clamp technique. *Sci. Amer.* 266 (1992): 28.

Weinreich, F. y T. J. Jentsch. Neurological diseases caused by ion-channel mutations. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10 (2000): 409.

Mielina

Pedraza, L., J. K. Huang y D. R. Colman. Organizing principles of the axoglial apparatus. *Neuron* 30 (2001): 335.

Steinman, L., R. Martin, C. Bernard, P. Conlon y J. Oksenberg. Multiple sclerosis: Deeper understanding of its pathogenesis reveals new targets for therapy. *Annu. Rev. Neurosci.* 25 (2002): 491.

Neurotransmisores y neuropéptidos

Nemeroff, C. B. The neurobiology of depression. *Sci. Amer.* 278 (June 1998): 42.

Nestler, E. J. y R. C. Malenka. The addicted brain. *Sci. Amer.* 290 (2004): 78.

Vincent, A., D. Beesonn y B. Lang. Molecular targets for autoimmune and genetic disorders of neuromuscular transmittion. *Eur. J. Biochem.* 267 (2000): 6717.

von Bohlen, O. y R. Dermietzel. *Neurotransmitters and Neuromodulators: Handbook of Receptors and Biological Effects.* Weinheim: Wiley-VCH (2002).

Transmisión sináptica

Galli, T. y H. Volker. Cycling of synaptic vesicles: How far? How fast! *Sci. STKE* 88 (2001): re1.

Harlow, M.L., D. Ress, A. Stoschek, R. M. Marshall y U. J. McMahan. The architecture of the active zone material at the frog's neuromuscular junction. *Nature* 409 (2001): 479.

Koh, T.-W. y H. J. Bellen. Synaptotagmin I, a Ca^{2+} sensor for neurotransmitter release. *Trends Neurosci.* 26 (2003): 413.



14

Mecanismos de transducción de señal: II. Mensajeros y receptores

En el capítulo anterior aprendimos cómo se comunican las células nerviosas entre ellas y con otros tipos celulares mediante cambios electroquímicos en sus membranas. Vimos cómo, en la mayoría de los casos, la llegada de un potencial de acción a una sinapsis produce la liberación de neurotransmisores, los cuales se unen a sus receptores en la membrana postsináptica de la célula adyacente, transmitiendo por tanto la señal.

Ahora estamos preparados para explorar una segunda forma principal de comunicación intercelular, que igualmente implica interacciones entre sustancias químicas y receptores. Sin embargo, en este caso la señal es transmitida por mensajeros químicos reguladores, y sus receptores están localizados en las superficies de las células, que pueden estar bastante distantes de las células secretoras. Así, los animales tienen dos sistemas, diferentes pero complementarios, de comunicación y control, y los receptores desempeñan un papel fundamental en ambos sistemas. En este capítulo nos encontraremos con algunos mecanismos generales a través de los cuales los receptores detectan y transmiten las señales químicas a las que está expuesta la célula.

Señales químicas y receptores celulares

Todas las células tienen la habilidad de explorar el medio y responder frente a señales químicas específicas. Por ejemplo, los procariotas tienen en la superficie celular moléculas de receptores unidos a membrana, que les permiten responder a sustancias presentes en el medio. El cuerpo humano tiene receptores en la lengua y en la nariz que detectan sustancias en la comida y en el medio. Como veremos, incluso las células de los embriones animales tempranos poseen una maquinaria sofisticada para detectar cambios en su medio.

Las células se comunican también entre ellas. Una forma de hacerlo es expresando moléculas en sus superficies, que son reconocidas por receptores en la superficie de otras células. Esta forma de comunicación célula a célula requiere que las células entren en contacto directo. De forma alternativa, una célula puede liberar señales químicas que son reconocidas por otra célula, bien en la vecindad o en una localización distante. Por ejemplo, en los organismos eucarióticos simples, las células ameboides del moho del lodo *Dictyostelium* secretan un compuesto llamado AMP cíclico (cAMP) en un estadio de su ciclo vital. El compuesto se une a receptores en la superficie de las células vecinas, desencadenando un proceso en el que se agregan miles de células ameboides y se diferencian en un organismo multicelular.

En organismos multicelulares más complejos, el problema de regular y coordinar las diversas actividades en las células o de los tejidos es particularmente importante, ya que todo el organismo se organiza en distintos tejidos compuestos por células especializadas. Además, las funciones específicas de esas células pueden ser críticas únicamente en determinadas ocasiones, o un tejido puede necesitar desempeñar funciones diferentes en circunstancias diferentes. Los organismos multicelulares a menudo controlan la actividad de células especializadas a través de la liberación de *mensajeros químicos*, que son el objeto de este capítulo.

Las células pueden recibir distintos tipos de señales químicas

Diversos compuestos pueden funcionar como mensajeros químicos que transmiten señales entre células (Figura 14.1). Las moléculas de señalización son a menudo clasificadas en base a la distancia entre su lugar de producción y el tejido o los tejidos diana sobre los que actúa. Algunos mensajeros, como las hormonas, actúan como **señales endocrinas** (de los términos griegos que significan «secretarse en»). Están producidas a grandes distancias de sus tejidos diana y son transportadas por el sistema circulatorio a diversos lugares del cuerpo. Otras señales, como los factores de crecimiento, son secretados localmente y difunden para actuar en un rango reducido de tejidos cercanos. Estas señales se denominan **señales paracrinas** (del griego *para*, que significa «al lado de»). Otro tipo de mediadores locales actúan sobre la misma célula que los produce; estas señales se llaman **señales autocrinas**. Una vez que un mensajero alcanza su tejidos diana, se une a **receptores** de la superficie de las células diana, iniciando el proceso de señalización. En la Figura 14.2 se muestra el flujo lógico y general de información implicado en este tipo de señalización química. Una molécula, tanto si procede de una distancia corta o larga, funciona como **ligando** uniéndose a un receptor. Un ligando, como vimos en el Capítulo 13, a menudo se une a un receptor incluido en la membrana plasmática de la célula que recibe la señal. En otros casos, como en las hormonas esteroideas, los ligandos se unen a receptores dentro de la célula. En cualquier caso, el ligando es un «mensajero primario». La unión del ligando al receptor a menudo produce moléculas adicionales dentro de la célula que recibe la señal. Estos **mensajeros secundarios** son pequeñas moléculas o iones que transmiten las señales de una localización celular, como la membrana plasmática, hacia el interior de la célula, iniciando una cascada de cambios dentro de la célula receptora. Generalmente estos procesos afectan a la expresión de genes específicos dentro de la célula receptora. El resultado último es un cambio en la identidad o en la función de la célula. La capacidad de una célula para traducir una interacción receptor-ligando en cambios en su comportamiento o su expresión génica se conoce como **transducción de señal**.

Las moléculas mensajeras pueden ser caracterizadas químicamente como aminoácidos o sus derivados, péptidos, proteínas, ácidos grasos, lípidos, nucleósidos o nucleótidos. Muchos mensajeros son compuestos hidrofílicos cuya función se basa enteramente en su capacidad para unirse a uno o más receptores específicos en la célula diana. En este caso, la composición química del mensajero no porta ninguna consecuencia directa sobre el tipo de mensaje transmitido a la diana; es principalmente importante porque proporciona la forma molecular correcta y puede formar los enlaces necesarios para encajar en el receptor.

Los mensajeros hidrofóbicos, por el contrario, actúan sobre receptores en el núcleo o en el citosol, cuya función es la de regular la transcripción de genes particulares. Entre los mensajeros hidrofóbicos que se unen a receptores intracelulares están las *hormonas esteroideas*, derivadas del compuesto colesterol, y los *retinoides*, derivados de la vitamina A. Debido a que los complejos receptor-ligando actúan en el núcleo, aplazaremos su discusión hasta el

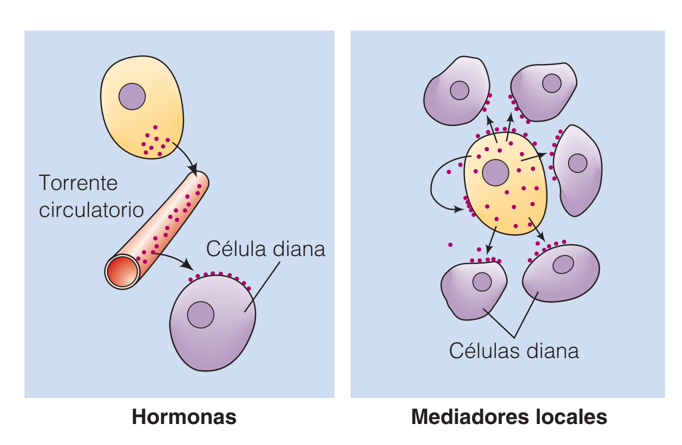


Figure 14.1 Señalización célula-célula mediante hormonas y mediadores locales. La principal diferencia entre las distintas clases de moléculas de señalización es la distancia que atraviesa la molécula antes de encontrar su tejido o su célula diana. Las hormonas actúan como señales endocrinas, y son transportadas por la circulación sanguínea. Los mediadores locales, como los factores de crecimiento, pueden actuar en las células vecinas (señales paracrinas), o en las células que los producen (señales autocrinas). Aunque muchas moléculas de señalización actúan en la superficie celular, algunas moléculas hidrofóbicas penetran en sus células diana.

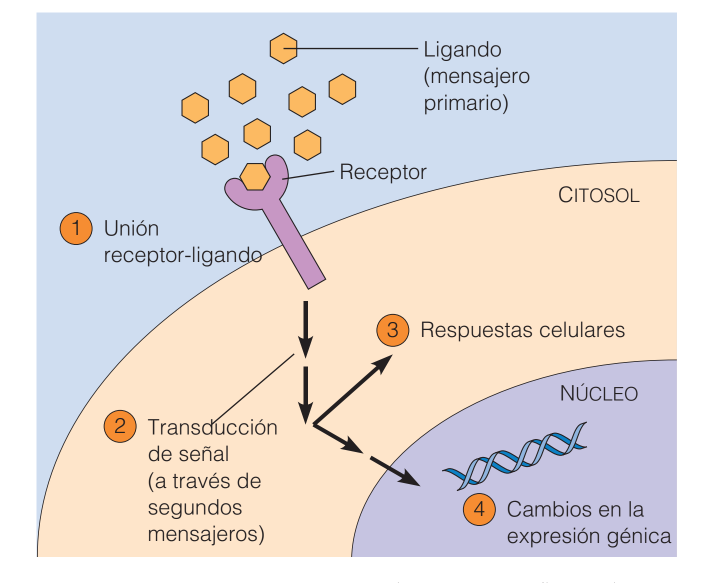


Figura 14.2 Flujo general de información durante la señalización celular. La unión de un ligando a un receptor activad una serie de procesos conocidos como transducción de señal, que transmiten la señal al interior de la célula, lo que produce respuestas celulares específicas y/o cambios en la expresión génica.

Capítulo 23, cuando tengamos una mejor comprensión de cómo se regula en las células la transcripción de genes específicos. Aquí, nos centraremos en los ligandos hidrofílicos y sus receptores de la superficie celular.

La unión de los ligandos a sus receptores indica interacciones específicas

¿Cómo distinguen las células a los mensajeros entre la multitud de otras sustancias químicas que las rodean o de los mensajeros destinados a otras células? La respuesta radica en la manera altamente específica en la que la molécula mensajera se une a su receptor. Los mensajeros forman enlaces químicos no covalentes con la proteína receptora. Los enlaces individuales no covalentes son generalmente débiles; por lo tanto, para conseguir una unión firme se deben formar numerosos enlaces. Para que un receptor establezca numerosos enlaces, el receptor debe tener un *sitio de unión* (o *bolsillo de unión*) en el que encaje la molécula de mensajero, igual que una mano en un guante. Además, dentro del sitio de unión al ligando en el receptor deben existir cadenas laterales de aminoácidos apropiadas para poder formar enlaces químicos con la molécula mensajera. La combinación de la forma del sitio de unión y el posicionamiento estratégico de las cadenas laterales de aminoácidos dentro del sitio de unión permite al receptor distinguir su ligando específico de otras miles de compuestos químicos.

En la mayoría de los casos, la reacción de unión entre un ligando y su receptor específico, conocido como **receptor emparentado**, es similar a la unión de una enzima a su sustrato. Los ligandos del fluido que rodea a la célula pueden colisionar con receptores y algunas de estas colisiones pueden dar lugar a la unión. Cuando un receptor une su ligando, el receptor se dice que está *ocupado*. De forma similar, el ligando puede estar o bien unido (a un receptor) o libre en la solución. La cantidad de receptor que está ocupado por ligando es proporcional a la concentración de ligando libre en solución. A medida que se incrementa la concentración de ligando, la proporción de sus receptores emparentados que estarán ocupados será mayor, hasta que la mayoría de los receptores están ocupados, condición que se conoce como saturación. En principio, el incremento adicional de la concentración de ligando no tendrá efecto sobre la célula diana.

Afinidad del receptor. La relación que existe entre la concentración del ligando en una solución y el número de receptores ocupados se puede describir cualitativamente en términos de **afinidad del receptor**. Cuando casi todos los receptores están ocupados a concentraciones bajas de ligando libre, decimos que el receptor tiene una alta afinidad por su ligando. Por el contrario, cuando se requiere una concentración relativamente alta de ligando para que se ocupen la mayoría de los receptores, decimos que el receptor tiene una afinidad baja por su ligando. La afinidad del receptor se puede describir cuantitativamente en términos de **constante de disociación,** K_d, que es la concentración de ligando libre necesaria para producir un estado en el que la mitad de los receptores están ocupados. Los valores de K_d oscilan entre 10^{-4} y 10^{-9} m*M*. Al igual que la constante de Michaelis (K_m, *véase* Capítulo 6) en la cinética enzimática, este valor es importante porque nos indica a qué concentración será efectivo un ligando en particular para producir una respuesta celular. Así, los receptores con una afinidad alta por sus ligandos tienen una constante de disociación muy pequeña, y por el contrario, los receptores de baja afinidad tienen K_d elevada. La concentración de ligando debe estar generalmente en el rango del valor de K_d del receptor para que el ligando ejerza efectos sobre el tejido diana.

Regulación a la baja del receptor. Aunque los receptores tienen una afinidad característica por sus ligandos, las células están preparadas para percibir *cambios* en la concentración de ligandos más que para detectar concentraciones fijas. Cuando un ligando está presente y los receptores están ocupados durante un periodo prolongado de tiempo, la célula se adapta, o se desensibiliza, de forma que deja de responder al ligando. Para estimular posteriormente la célula, la concentración de ligando se debe incrementar.

La desensibilización se debe principalmente a cambios en las propiedades o en la localización celular del receptor, fenómeno conocido como *regulación a la baja* de receptores. La *regulación a la baja* de receptores se produce de distintas maneras, incluyendo (1) la retirada del receptor de la superficie celular, (2) alteraciones en el receptor que conducen a una menor afinidad por el ligando, o (3) alteraciones que hacen que el receptor sea incapaz de producir cambios en la función celular. La retirada de receptores de la superficie celular tiene lugar a través de un proceso llamado *endocitosis mediada por receptor*, en el que se invaginan y se internalizan pequeñas porciones de la membrana plasmática que contienen a los receptores. (La endocitosis mediada por receptor se discutió detalladamente en el Capítulo 12.) La reducción del número de receptores en la superficie celular produce que la respuesta celular a ligando esté disminuida. Los receptores que se alteran químicamente, a menudo por fosforilación, pueden permanecer en la superficie pero no responden a la presencia del ligando, bien porque han reducido su afinidad por éste o porque son incapaces de producir cambios en las funciones celulares.

La desensibilización proporciona a las células una manera de adaptarse a las diferencias permanentes en la concentración de mensajeros. Sin embargo, también conduce al fenómeno de *tolerancia*. Un ejemplo de esto se puede observar con las gotas nasales, que contienen neosinefrina u otros compuestos que estimulan receptores particulares denominados α-adrenérgicos que veremos más tarde en este capítulo. Estos compuestos producen constricción de los vasos sanguíneos de la nariz y por lo tanto congestión

nasal. Sin embargo, el uso prolongado produce una pérdida de efectividad debido a la *regulación a la baja* de los receptores.

El conocimiento de la naturaleza de la unión receptor-ligando ha proporcionado grandes oportunidades a los investigadores y a las compañías farmacéuticas. Aunque los receptores tienen sitios de unión en los que encajan las moléculas de mensajero de manera precisa, es posible generar ligandos sintéticos que se unen incluso con mayor selectividad. Esto es especialmente importante cuando existe más de un tipo de receptor para el mismo ligando. Se han generado muchos compuestos sintéticos que actúan selectivamente sobre un único tipo de receptor. Además, mientras los mensajeros normales producen un cambio en el receptor al unirse a él, se ha observado que algunos de los compuestos tanto sintéticos como los naturales se pueden unir sin generar estos cambios. Estos **antagonistas** inhiben al receptor evitando la unión del mensajero natural y la activación del receptor. Otros compuestos que se denominan **agonistas** activan al receptor al que se unen.

Las sustancias que activan o inhiben selectivamente a tipos particulares de receptores tienen un papel central en el tratamiento de numerosos problemas médicos. Por ejemplo, el *isoproterenol* y el *propanolol* activan o inhiben receptores β-adrenérgicos, lo que discutiremos más tarde en este capítulo. El isoproterenol se emplea para tratar el asma o para estimular el corazón, mientras que el propanolol se emplea para reducir la presión sanguínea y la fuerza de las contracciones cardíacas y para controlar los ataques de ansiedad. Otro ejemplo es la *famotidina*, un compuesto que se une selectivamente a un tipo particular de receptores de histamina presentes en las células del estómago a los que inhibe. La famotidina se comercializa como un «controlador de la acidez» del estómago bajo el nombre comercial de Pepcid AC. La *cimetidina* es otro compuesto, comercializado con el nombre comercial de Tagamet, que actúa de manera similar.

La unión al receptor activa una secuencia de procesos de transducción de señal dentro de la célula

Cuando se une un ligando a su receptor correspondiente, el receptor se altera de forma que produce cambios en alguna actividad celular. En general, la unión de un ligando o bien induce un cambio en la conformación del receptor o la asociación de receptores. Una vez que tiene lugar alguno de esos cambios, el receptor inicia una secuencia preprogramada de procesos dentro de la célula. Con el término *preprogramado* queremos decir que las células tienen un repertorio de funciones mayor que las que están activadas en un momento determinado. Algunos de estos procesos celulares permanecen sin utilizar hasta que se reciben las señales apropiadas que los desencadenan. Podemos hacer una comparación entre el efecto de activación de un mensajero y la estimulación de un reflejo. Por ejemplo, en el reflejo rotuliano, las conexiones nerviosas están presentes previamente y pueden producir la extensión de la pierna en respuesta a un golpe inmediatamente por debajo de la rodilla, pero el golpe es necesario para la activación del reflejo. De manera similar, un mensajero activa una serie de funciones celulares que están previamente dispuestas pero que no están siendo utilizadas.

Las vías de transducción de señal permiten otro aspecto importante de la respuesta celular a una señal externa: la *amplificación de la señal.* A menudo, cantidades extremadamente pequeñas de un ligando son suficientes para generar una respuesta en la célula diana, e incluso la respuesta de la célula diana puede ser muy dramática. Frecuentemente, la respuesta intensa de una célula diana produce en ella una cascada de señalización. En cada paso de la cascada, un intermediario de la señalización permanece el tiempo suficiente para estimular la producción de muchas moléculas necesarias para el siguiente paso de la cascada, multiplicando, por tanto, los efectos de la simple interacción receptor-ligando en la superficie celular. Un ejemplo bien conocido de amplificación de señal consiste en la hidrólisis del glucógeno en las células hepáticas en respuesta a la hormona adrenalina (Figura 14.3). Como veremos, este proceso implica a un receptor acoplado a proteína G en la superficie celular, que inicia una cascada de señalización dentro de la célula hepática. Como resultado de esta cascada, la unión de una única molécula de adrenalina puede desencadenar la producción de cientos de millones de moléculas de glucosa.

Cuando se une un ligando a su receptor apropiado en la superficie o el interior celular se inician o se alteran los procesos de transducción de señal. Para comprender estas vías y la forma en que las hormonas, entre otros mensajeros, producen cambios en las funciones celulares necesitamos conocer lo que hace un receptor cuando se une a su ligando. Dependiendo del modo de acción, los receptores se pueden clasificar en diversas categorías básicas. En el Capítulo 13, estudiamos los *canales dependientes de ligando*, y en el Capítulo 23 consideraremos los *receptores intracelulares.* Este Capítulo centra su atención en una tercera categoría, los *receptores de la membrana plasmática.* Muchos de estos receptores se pueden clasificar en dos familias: receptores unidos a proteínas G y receptores unidos a proteínas kinasa. Comenzaremos atendiendo a los primeros.

Receptores acoplados a proteínas G

Los receptores con siete dominios transmembrana actúan a través de proteínas G

La familia de receptores acoplados a proteínas G se denominan así debido a que la unión al receptor produce un cambio en su conformación que activa a alguna **proteína G** en particular (abreviatura de *proteína de unión a nucleóti-*

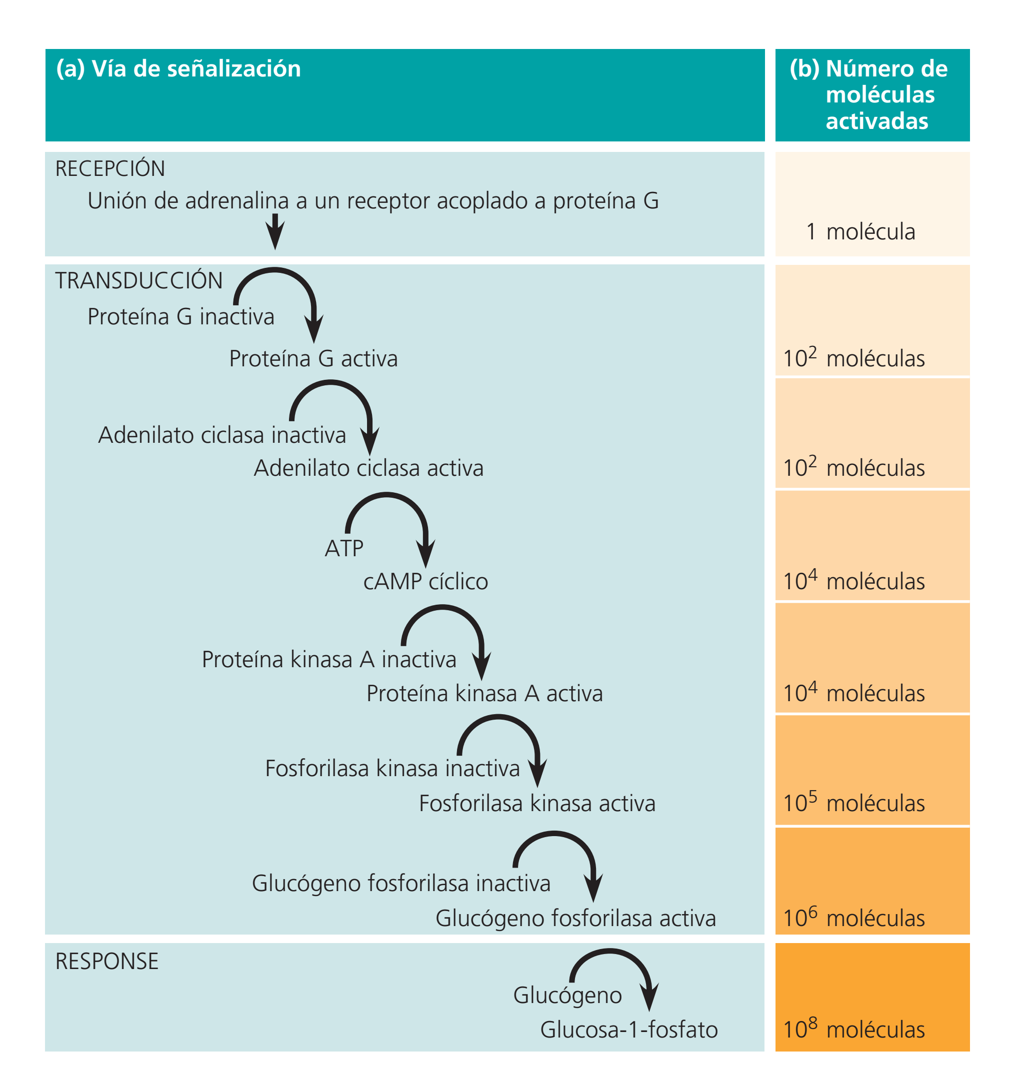


Figura 14.3 Las vías de transducción de señal pueden amplificar la respuesta celular a una señal externa. Las células hepáticas responden a la hormona adrenalina y fragmentando glucógeno para liberar glucosa-1-fosfato. (**a**) El receptor de adrenalina es un receptor acoplado a proteína G, que activa una enzima conocida como adenilato ciclasa. La adenilato ciclasa cataliza la formación de un mensajero secundario, cAMP, que activa una proteína kinasa (proteína kinasa A), que entonces activa a otra kinasa (fosforilasa-kinasa). Finalmente, se activa la enzima glucógeno fosforilasa, que cataliza la hidrólisis de glucógeno. (**b**) A la derecha se muestra el número aproximado de moléculas producido en cada paso. Cada molécula de adrenalina es capaz de desencadenar la producción de cientos de millones de moléculas de glucosa-1-fosfato.

dos de guanina). A continuación, la proteína G activada se une a una proteína diana como una enzima o una proteína canal, que por lo tanto altera su actividad. Todos los receptores acoplados a proteínas G inician de esta forma la transducción de señales dentro de las células. Entre los ejemplos de receptores acoplados a proteínas G se incluyen receptores olfativos (responsables de nuestro sentido del olfato), receptores de noradrenalina y receptores de hormonas como los de la hormona estimulante del tiroides o la hormona estimulante de los folículos.

Estructura de los receptores acoplados a proteínas G. Los receptores acoplados a proteínas G son muy característicos ya que tienen una estructura similar aunque difieran de forma significativa en sus secuencias de aminoácidos. En cada caso, la proteína del receptor forma siete α-hélices transmembrana conectadas por dominios o lazos citosólicos o extracelulares. El extremo N-terminal de la proteína está expuesto al fluido extracelular, mientras que el C-terminal se localiza en el citosol (Figura 14.4). La porción extracelular de cada receptor acoplado a proteínas G tiene un sitio específico de unión al mensajero, y el dominio citosó-

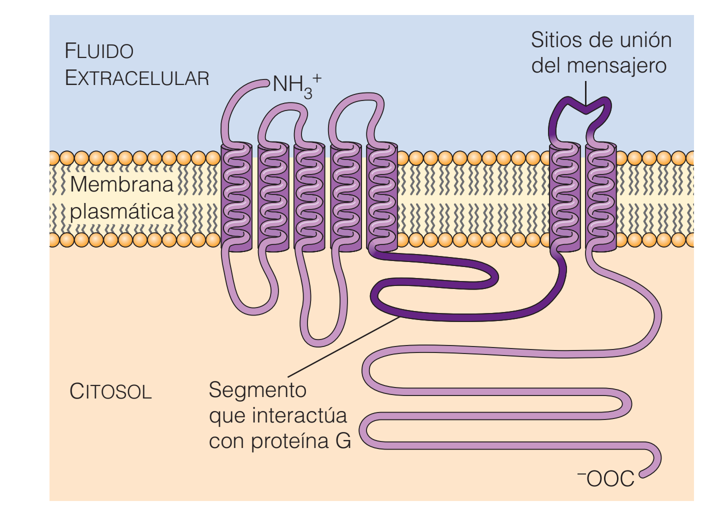


Figura 14.4 Estructura de receptores acoplados a proteínas G. Cada receptor acoplado a proteína G tiene siete α hélices transmembrana. El mensajero primario se une a la porción extracelular del receptor. Esta unión produce que la porción extracelular del receptor active a una proteína G adyacente.

lico que conecta la quinta y la sexta α-hélice es específico para una proteína G en particular. Los receptores acoplado a proteínas G, por lo tanto, constituyen una forma versátil de unir mensajeros diferentes a distintas vías de transducción de señal.

Estructura y activación de proteínas G. Podemos describir a las proteínas G como un tipo de interruptor molecular cuyo estado «encendido» o «apagado» depende de si la proteína está unida a GTP o a GDP. Existen dos clases de proteínas G distintas: las *proteínas G grandes heterotriméricas* y las *proteínas G pequeñas monoméricas.* Las proteínas G grandes heterotriméricas contienen tres subunidades diferentes denominadas G alpha (G_α), G beta (G_β) y G gamma (G_γ). Las proteínas G heterotriméricas intervienen en la transducción de señal a través de receptores acoplados a proteínas G. Las proteínas G pequeñas monoméricas incluyen a *Ras,* que discutiremos más tarde en este capítulo en el contexto de los receptores tirosina kinasa. En el Capítulo 15 discutiremos otras proteínas G monoméricas pequeñas parecidas estructuralmente a Ras y que regulan al citoesqueleto. Aunque el término *proteínas G* se puede aplicar tanto a los tipos monomérico y trimérico, únicamente lo emplearemos para referirnos al tipo trimérico.

Todas las proteínas G tienen la misma estructura básica y el mismo modo de activación. De las tres subunidades del heterotrímero $G_{\alpha\beta\gamma}$, G_α es la más grande y se une a un nucleótido de guanina (GDP o GTP). Cuando G_α se une a GTP se separa del complejo $G_{\beta\gamma}$. Por el contrario, las subunidades G_β y G_γ están unidas permanentemente. Algunas proteínas G, como *Gs* actúan como estimuladores de la transducción de señal (por lo tanto, *s* hace referencia a «estimulador»); otros como *Gi* funcionan para inhibir la señal de transducción (por tanto, *i* hace referencia a «inhibidor»).

Cuando un mensajero se une a un receptor acoplado a proteína G de la superficie celular, el cambio de conformación del receptor produce que la proteína G se asocie con el receptor, que a su vez produce que la subunidad G_α libere el GDP que lleva unido, adquiera GTP, y se despegue entonces del complejo (Figura 14.5). Dependiendo del tipo de

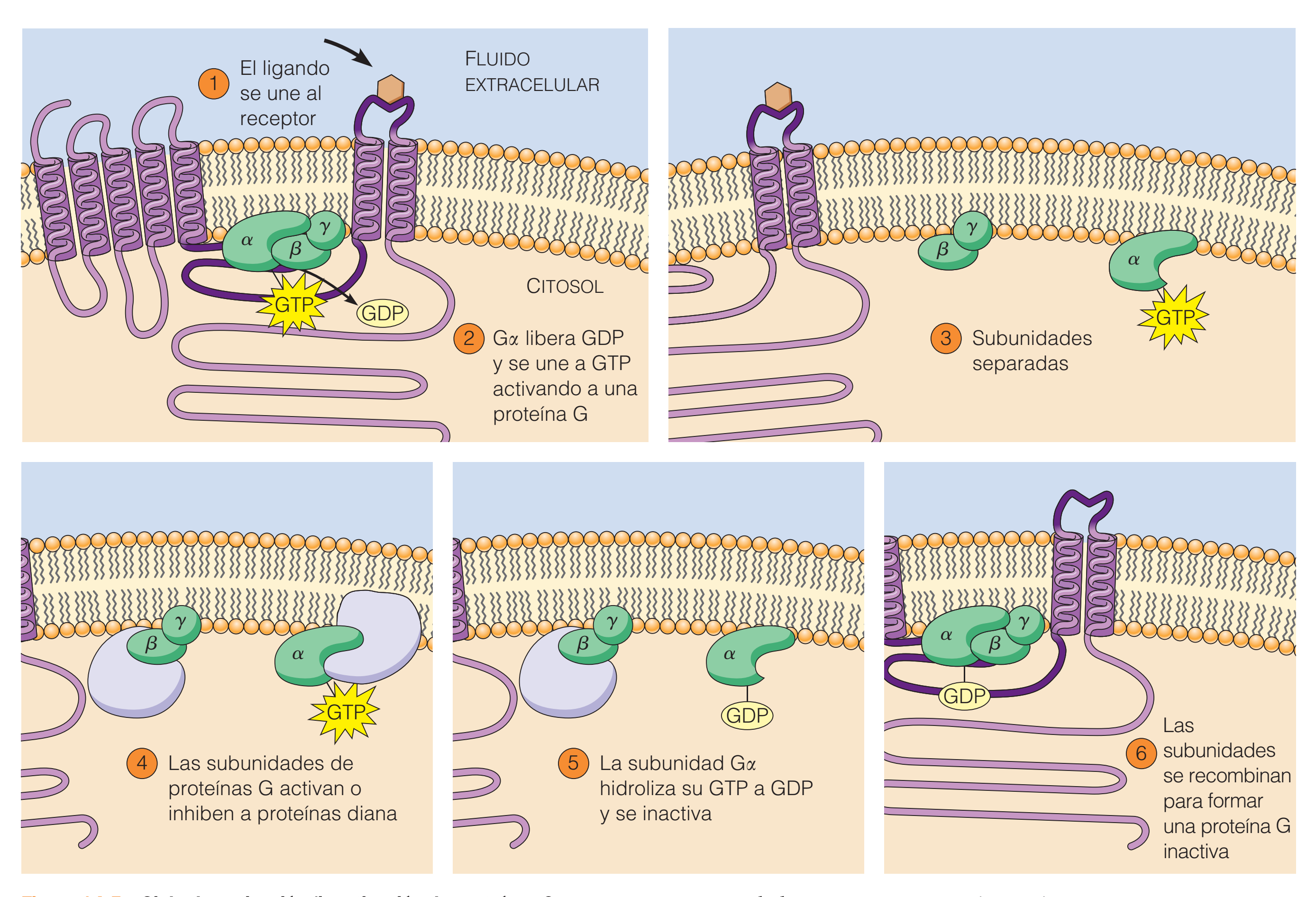


Figura 14.5 **Ciclo de activación/inactivación de proteínas G.** Los receptores acoplados a proteínas G contienen siete segmentos transmembrana que forman el sitio de unión al ligando en el exterior de la célula, y dentro un sitio de unión a proteínas G. ① Cuando se une el ligando, ② el receptor activa a una proteína G produciendo que la subunidad G_α libere GDP y adquiera GTP. ③ Las subunidades G_α y $G_{\beta\gamma}$ entonces se separan, y ④ inician procesos de transducción de señal. ⑤ La subunidad GTP-G_α finalmente hidroliza su GTP, lo que la hace retornar a su forma inactiva GDP-G_α. ⑥ La subunidad GDP-G_α inactiva se recombina entonces con $G_{\beta\gamma}$ para formar una proteína G heterotrimérica inactiva.

proteína G y del tipo de célula, tanto la subunidad GTP-G_α libre o el complejo $G_{\beta\gamma}$ pueden iniciar procesos de transducción de señal en la célula. Cada porción de la proteína G desencadena su efecto mediante la unión a una enzima o a una proteína particular de la célula. En algunos casos, tanto las subunidades GTP-G_α como GTP-$G_{\beta\gamma}$ regulan simultáneamente procesos diferentes en el citosol. Sin embargo, la actividad de la proteína persiste únicamente mientras la subunidad G_α está unida a GTP y las subunidades permanecen separadas. Debido a que la subunidad G_α hidroliza GTP, solamente permanecerá activa por un periodo corto de tiempo antes de revertir al estado unido a GDP y reasociarse con $G_{\beta\gamma}$. Esta propiedad permite que la vía de transducción de señal se detenga de manera rápida cuando se retira el mensajero.

El gran número de proteínas G diferentes proporciona diversidad a los eventos de transducción de señal mediados por proteínas G. Por ejemplo, algunos receptores del neurotransmisor GABA no actúan directamente como canales iónicos (*véase* Capítulo 13). Por el contrario, son receptores acoplados a proteínas G que actúan indirectamente sobre canales iónicos en la sinapsis. Quizá los eventos de transducción de señal mediados por proteínas G más importantes y extendidos consisten en la liberación de mensajeros secundarios. El AMP cíclico y los iones de calcio son dos mensajeros secundarios usados ampliamente que estimulan la actividad de enzimas diana cuando se elevan sus concentraciones citosólicas. Como veremos a continuación, los receptores acoplados a proteínas G pueden estimular la elevación de AMP cíclico o de calcio, dependiendo de la proteína G y que se active.

Un tipo de proteína G emplea AMP cíclico como mensajero secundario

El **AMP cíclico (cAMP)** se forma a partir del ATP citosólico mediante la enzima **adenilato ciclasa** (Figura 14.6). La adenilato ciclasa está anclada a la membrana plasmática con su porción catalítica sobresaliendo hacia el citosol. Normalmente, la enzima es inactiva hasta que se une con una subunidad α activa de la proteína G específica Gs. Cuando un receptor acoplado a proteínas G, está unido a Gs, la unión del ligando estimula que la subunidad Gs_α libere GDP y adquiera GTP (Figura 14.7). Esto produce a continuación que el GTP-Gs_α se separe de las subunidades $Gs_{\beta\gamma}$ y se una a la adenilato ciclasa. Cuando GTP-Gs_α se une a la adenilato ciclasa, la enzima se activa y cataliza la conversión de ATP en cAMP.

Las proteínas G responden rápidamente a cambios en las concentraciones de ligando debido a que permanecen activas únicamente por un periodo corto de tiempo antes de que la subunidad G_α hidrolice el GTP que lleva unido y se inactive. Una vez que la proteína G es inactivada, la adenilato ciclasa detiene su producción de cAMP. Sin embargo, los niveles de cAMP permanecerían elevados en la célula a no ser por la enzima **fosfodiesterasa** que lo degrada. Esto asegura aún más que la vía de transducción de señal se detendrá rápidamente cuando disminuye la concentración de ligando fuera de la célula.

El AMP cíclico parece tener una diana intracelular principal, la enzima conocida como kinasa dependiente de cAMP o **proteína kinasa A (PKA)**. La proteína kinasa A fosforila a una amplia variedad de proteínas celulares, trans-

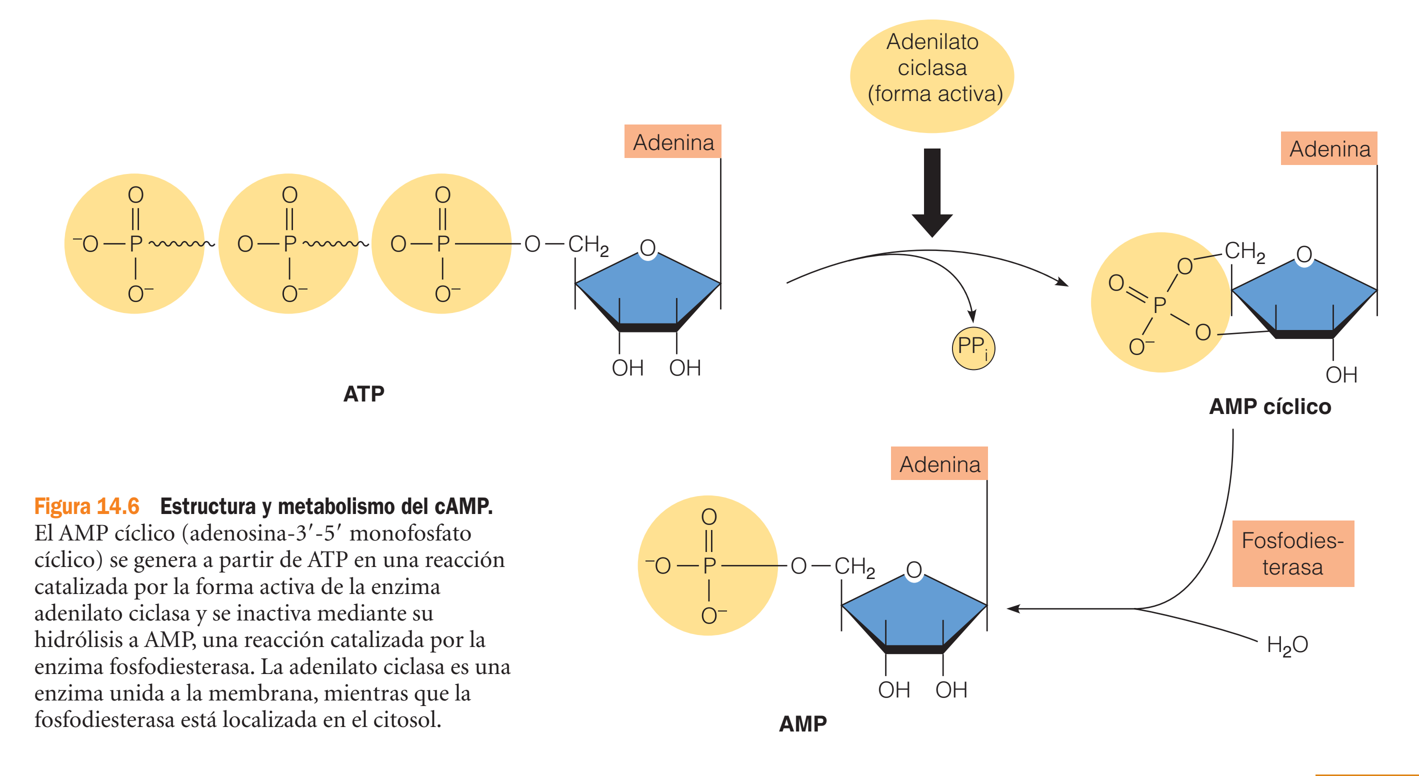


Figura 14.6 Estructura y metabolismo del cAMP. El AMP cíclico (adenosina-3′-5′ monofosfato cíclico) se genera a partir de ATP en una reacción catalizada por la forma activa de la enzima adenilato ciclasa y se inactiva mediante su hidrólisis a AMP, una reacción catalizada por la enzima fosfodiesterasa. La adenilato ciclasa es una enzima unida a la membrana, mientras que la fosfodiesterasa está localizada en el citosol.

firiendo un fosfato del ATP a una serina o una treonina presentes dentro de la proteína diana. El AMP cíclico regula la actividad de PKA, causando la disociación de sus dos subunidades reguladoras de las dos subunidades catalíticas (Figura 14.8). Una vez que las subunidades catalíticas están libres, PKA puede catalizar la fosforilación de varias proteínas en la célula.

Un incremento en la concentración de cAMP puede producir muchos efectos diferentes en distintos tipos celulares. Cuando se eleva el cAMP se estimula la hidrólisis del glucógeno en el músculo esquelético y en las células hepáticas. En el músculo cardíaco, la elevación de cAMP incrementa la contracción muscular mientras que en el músculo liso se inhibe la contracción. La elevación de cAMP en las plaquetas inhibe su movilización durante la coagulación sanguínea y en las células epiteliales intestinales produce la secreción de sales y agua hacia la luz intestinal. Cada una de estas reacciones es un ejemplo de respuesta preprogramada como discutimos anteriormente. De hecho, si la concentración de cAMP se incrementa artificialmente en esos distintos tipos celulares, se pueden desencadenar las mismas respuestas celulares incluso en ausencia del ligando. Esto se puede hacer de dos formas: o bien estimulando la producción de cAMP directamente o mediante la inhibición de la enzima fosfodiesterasa, que degrada el cAMP. Esto último conduce a la elevación de los niveles de cAMP debido a que siempre hay un nivel basal de producción de cAMP en las células, y la inhibición de la fosfodiesterasa produce por tanto su acumulación al no degradarse. Algunos ejemplos de inhibidores de la fosfodiesterasa incluyen a las *metilxantinas*, compuestos como la cafeína o la teofilina presentes en el café, té y algunos refrescos. (La teofilina se emplea a menudo para tratar el asma debido a que relaja la musculatura lisa de los bronquios.)

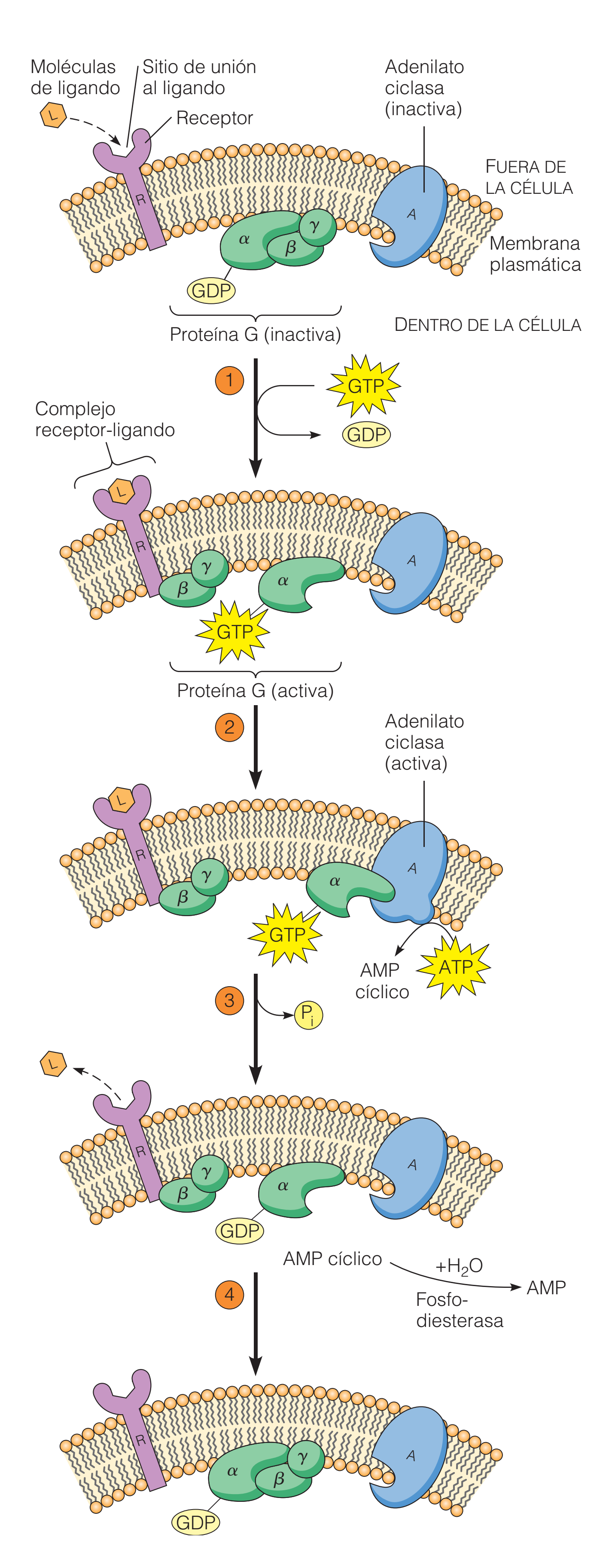


Figura 14.7 Papel de las proteínas G y del AMP cíclico en la transducción de señal. Las proteínas G intervienen en la transducción de señal a través de los receptores acoplados a proteínas G. Cuando los mensajeros se unen a su receptor, se activa la proteína G. En el estado inactivo, las subunidades α, β y γ están presentes formando un complejo que tiene unido GDP a la subunidad α. ① Cuando un receptor es activado, por la unión de su ligando específico en la superficie externa de la membrana plasmática, el complejo receptor-mensajero se asocia con la proteína G, produciendo el desplazamiento de GDP por GTP y la disociación del complejo Gs_α-GTP. ② El complejo Gs_α-GTP se puede entonces unir estrechamente a una molécula de adenilato ciclasa unida la membrana, activando la síntesis de cAMP. ③ La activación termina cuando el ligando abandona el receptor, el GTP es hidrolizado a GDP por la actividad GTPasa de la subunidad Gs_α, y la subunidad Gs_α se disocia de la adenilato ciclasa. ④ La adenilato ciclasa entonces revierte a su forma inactiva, la subunidad Gs_α se asocia con el complejo $Gs_{\beta\gamma}$ y las moléculas de cAMP del citosol se hidrolizan a AMP a través de la enzima fosfodiesterasa.

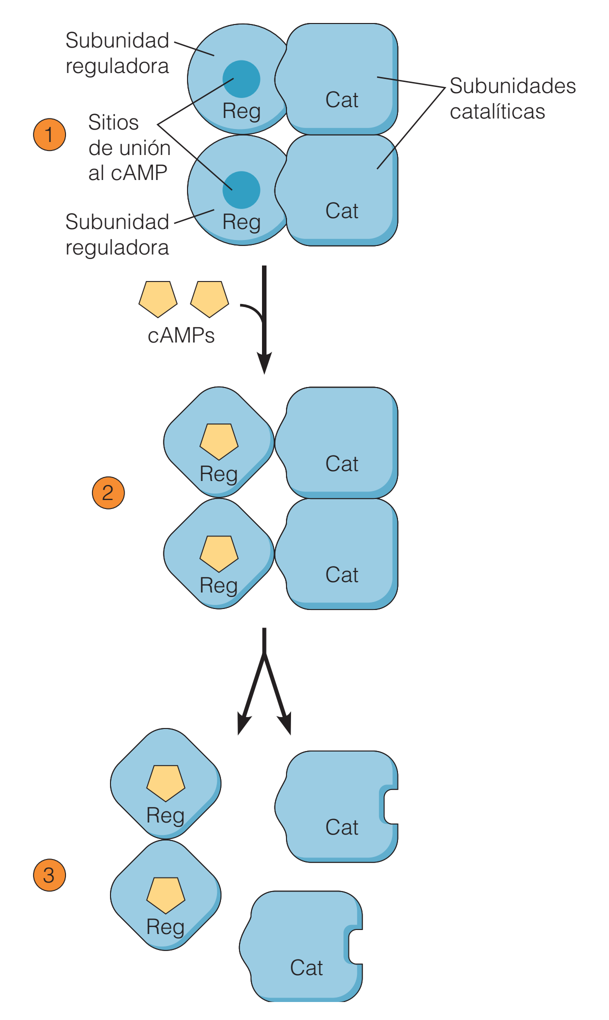


Figura 14.8 Activación de la proteína kinasa A por AMP cíclico. ① La proteína kinasa A está compuesta por cuatro subunidades, dos catalíticas y dos reguladoras. Las subunidades reguladoras inhiben a las subunidades catalíticas en ausencia de cAMP. ② El AMP cíclico activa a la proteína kinasa mediante su unión a las subunidades reguladoras. Cuando el cAMP se une, las subunidades reguladoras cambian su conformación y ③ se disocian, liberando a las subunidades catalíticas. Una vez que las subunidades catalíticas se están libres, están activadas y son capaces de fosforilar proteínas diana en la célula.

La interrupción de la señalización por proteínas G produce numerosas enfermedades humanas

¿Qué sucedería si el sistema proteína G-adenilato ciclasa no se pudiese detener? Esta pregunta se puede responder examinando lo que sucede en dos enfermedades humanas producidas por bacterias. Las bacterias *Vibrio cholerae* (que produce cólera) y *Bordetella pertussis* (que causa tosferina) producen patologías a través de sus efectos sobre proteínas G heterotriméricas.

El cólera se produce por la secreción de la *toxina colérica* cuando *V. cholerae* coloniza el intestino. La toxina altera la secreción de sales (cloruro sódico y bicarbonato sódico) y fluidos en el intestino, que normalmente están regulados por hormonas que actúan a través de las proteínas G_s, lo que altera los niveles intracelulares de cAMP. Una parte de la toxina colérica es una enzima que modifica químicamente a G_s, de forma que no puede continuar hidrolizando GTP a GDP. Como consecuencia, G_s no puede detenerse, los niveles de cAMP permanecen altos y las células intestinales secretan grandes cantidades de agua y sales. En ausencia de tratamiento este estado puede producir la muerte por deshidratación. La *toxina pertúsica*, secretada por *B. pertussis*, actúa de manera semejante, pero sobre una proteína G inhibidora, G_i. Esta proteína normalmente inactiva a la adenilato ciclasa. Cuando G_i es inactivada por la toxina pertúsica no puede continuar inhibiendo a la adenilato ciclasa, sin embargo, no está claro por qué la inactivación de la adenilato ciclasa produce tosferina.

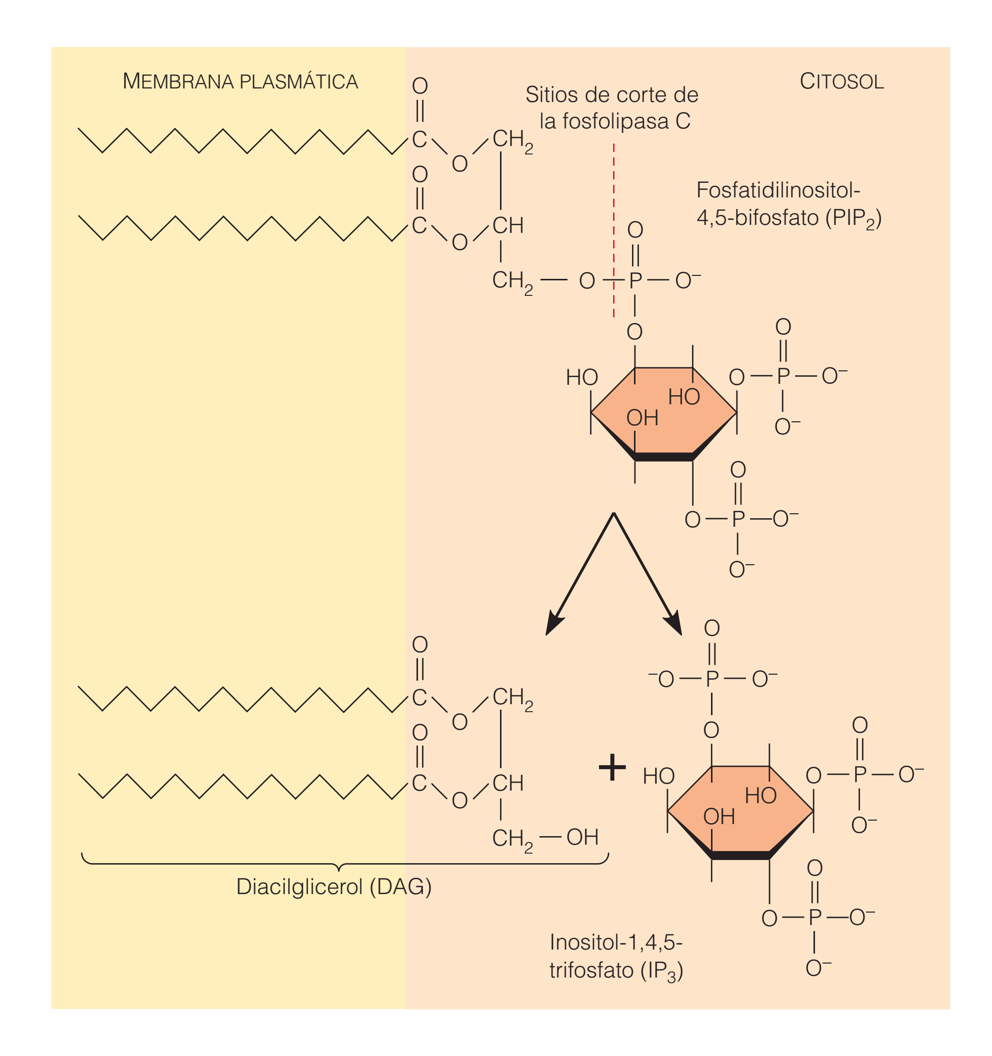
El descubrimiento de estas toxinas y de su modo de acción ha proporcionado no sólo avances en el tratamiento médico, sino también herramientas poderosas para estudiar la transducción de señal mediada por proteínas G. Debido a que estas dos toxinas actúan sobre distintas proteínas G, los investigadores han sido capaces de emplear las toxinas purificadas para asociar una vía de señalización con una proteína G en particular.

Muchas proteínas G usan inositol trifosfato y diacilglicerol como segundos mensajeros

La importancia de los fosfolípidos de inositol en la señalización celular fue puesta de manifiesto en los estudios pioneros de Robert Michell y Michael Berridge. En los primeros años de la década de los 80, Berridge se dio cuenta de que cuando se estimulaba la secreción de las glándulas salivales de una cierta larva de insecto se producían cambios en los fosfolípidos de inositol de la membrana. Ahora sabemos que el **inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3)**, uno de los productos de la hidrólisis de los fosfolípidos de inositol, funciona como mensajero secundario. IP_3 se genera a partir de *fosfatidilinositol-4,5-bifosfato* (PIP_2), un fosfolípido de membrana relativamente poco común, cuando se activa la enzima **fosfolipasa C.** La fosfolipasa C escinde PIP_2 en dos moléculas: inositol trifosfato y **diacilglicerol (DAG)** (Figura 14.9). Si la secuencia de procesos que observó Berridge se produjera sólo en las glándulas salivales de los insectos, sus descubrimientos no hubieran constituido más que una nota modesta en la historia de la transducción de señal. Sin embargo, rápidamente se demostró que IP_3 y DAG eran segundos mensajeros que regulan diversas funciones, algunas de las cuales se indican en la Tabla 14.1. Se conocen muchos receptores diferentes de la superficie celular que activan esta vía y cada año se descubren nuevos ejemplos.

En la Figura 14.10 se muestra el papel de IP_3 y DAG como segundos mensajeros en la vía inositol-fosfolípidos-calcio. La secuencia comienza con la unión de un ligando a su receptor de membrana, permitiendo la activación de una proteína G específica llamada G_p («p» hace referencia a la

Figura 14.9 Formación de inositol trifosfato y diacilglicerol. El inositol trifosfato (IP_3) y el diacilglicerol (DAG) se forman cuando la fosfolipasa C hidroliza fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP_2), uno de los fosfolípidos presentes en la membrana. IP_3 es liberado al citosol, mientras que DAG permanece en la membrana. Tanto IP_3 como DAG son segundos mensajeros implicados en diversas vías de transducción de señal.



activación de fosfolipasa C). G_p entonces activa una forma de la fosfolipasa C conocida como C_b, y genera por lo tanto IP_3 y DAG. El inositol trifosfato es soluble en agua y difunde rápidamente a través del citosol, uniéndose a un canal de calcio dependiente del ligando, conocido como el canal del **receptor de IP_3** del retículo endoplásmico. Cuando IP_3 se une, el canal se abre liberando iones de calcio en el citosol. El calcio se une entonces a una proteína conocida como calmodulina (que discutiremos en breve), y el complejo calcio-calmodulina activa el proceso biológico deseado.

El DAG generado por la actividad de la fosfolipasa C permanece en la membrana, donde activa a miembros de la familia de la enzimas **proteína kinasa C (PKC).** PKC puede entonces fosforilar grupos específicos serina y treonina en diversas proteínas diana, dependiendo del tipo celular. El papel de DAG fue establecido experimentalmente mostrando que sus efectos pueden ser emulados por *ésteres de forbol*, metabolitos de plantas que se unen a PKC activándola directamente. Los investigadores, empleando diversos agentes farmacológicos, mostraron que la liberación de calcio estimulada por IP_3 y la actividad kinasa mediada por DAG son necesarias para producir la respuesta completa de las células diana.

Se han asociado una amplia variedad de efectos celulares a la activación de la proteína kinasa C, incluyendo la estimulación del crecimiento celular, la regulación de canales iónicos, cambios en el citoesqueleto, incrementos en el pH celular, y efectos en la secreción de proteínas y de otras sustancias.

Tabla 14.1 Ejemplos de funciones celulares reguladas por inositol trifosfato y diacilglicerol

Función regulada	Tejido diana	Mensajero
Activación de plaquetas	Plaquetas sanguíneas	Trombina
Contracción muscular	Músculo liso	Acetilcolina
Secreción de insulina	Páncreas endocrino	Acetilcolina
Secreción de amilasa	Páncreas exocrino	Acetilcolina
Degradación del glucógeno	Hígado	Hormona antidiurética
Producción de anticuerpos	Linfocitos B	Antígenos extraños

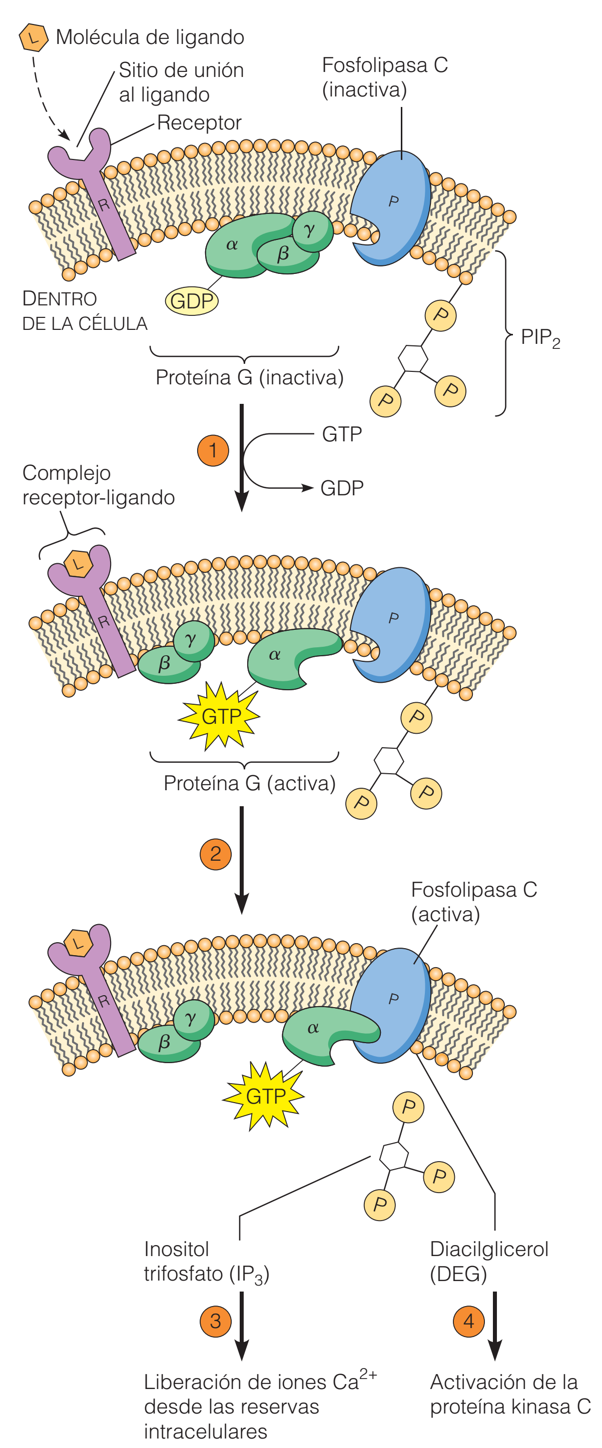


Figura 14.10 **Papel de IP_3 y DAG en la transducción de señal.** ① Cuando un receptor (R) es activado mediante la unión de su ligando (L) en la superficie externa de la membrana plasmática, el complejo receptor-ligando se asocia con la proteína G_p, lo que produce el desplazamiento de GDP por GTP y la disociación del complejo GTP-G_α. ② El complejo GTP-G_α se une entonces a la fosfolipasa C (P) activándola y produciendo la hidrólisis de PIP_2 para dar IP_3 y DAG, ③ IP_3 es liberado al citosol, donde desencadena la liberación de calcio. ④ El DAG permanece la membrana donde activa a la proteína kinasa C.

La liberación de iones de calcio es un evento clave en muchos procesos de señalización

¿Cómo sabemos que la secuencia de eventos que se muestra en la Figura 14.10, especialmente la unión entre la señalización por IP_3 y la liberación de calcio dentro de las células, ocurre realmente en las células? La respuesta comienza con la observación de que un fenómeno fisiológico específico —en este caso la secreción de saliva— era activado por los productos de la acción de la fosfolipasa: IP_3 y DAG. La evidencia del papel del calcio fue proporcionada por una aproximación experimental que implicó la inyección de un colorante fluorescente dependiente de calcio, como fura-2, en una célula diana. Debido a que la fluorescencia del colorante varía con la concentración de calcio, el colorante es un indicador sensible de la concentración de calcio intracelular. Nos referimos comúnmente a estos colorantes como **indicadores de calcio** (Figura 14.11). Midiendo el incremento de fluorescencia en respuesta a la activación de un ligando, o de IP_3 directamente, los investigadores fueron capaces de establecer que la unión del ligando produce un incremento de la concentración de IP_3, que a su vez produce una elevación de la concentración citosólica de calcio. Más recientemente, se han usado proteínas llamadas «camaleones», producidas por ingeniería genética y que incrementan su fluorescencia en respuesta a la elevación de calcio, para monitorizar los niveles de calcio citosólicos.

Para completar la secuencia de procesos, el incremento en la concentración de calcio tiene que asociarse a la propia respuesta fisiológica de la célula diana. Esta unión fue establecida mediante el tratamiento de las células diana con un **ionóforo de calcio** (como la ionomicina o A23187) en ausencia de calcio extracelular. El ionóforo hace que las membranas sean permeables al calcio, liberando por tanto las reservas intracelulares de calcio en ausencia de un estímulo fisiológico. El tratamiento con el ionóforo de calcio simuló el efecto de IP_3, implicando así al calcio como un intermediario en la vía de transducción de señal del IP_3.

Los iones de calcio (Ca^{2+}) desempeñan un papel esencial en la regulación de diversas funciones celulares. La Figura 14.12 proporciona una visión general de los diversos mecanismos de regulación de la concentración de calcio. La concentración de calcio se mantiene normalmente a niveles muy bajos en el citosol, debido a la presencia de **ATPasas de calcio** en las membranas plasmáticas y del retículo endoplásmico. Las ATPasas de calcio en la membrana plasmática transportan calcio fuera de la célula, mientras que las ATPasas en el ER secuestran iones de calcio en el lumen del ER. Además, algunas células tienen intercambiadores sodio-calcio que reducen aún más la concentración citosólica de calcio. Finalmente, la mitocondria puede transportar calcio hacia la matriz mitocondrial. La actividad de las ATPasas de calcio mantiene la concentración de calcio en el citosol alrededor de 1×10^{-4} mM en la mayoría de las células en estado de reposo.

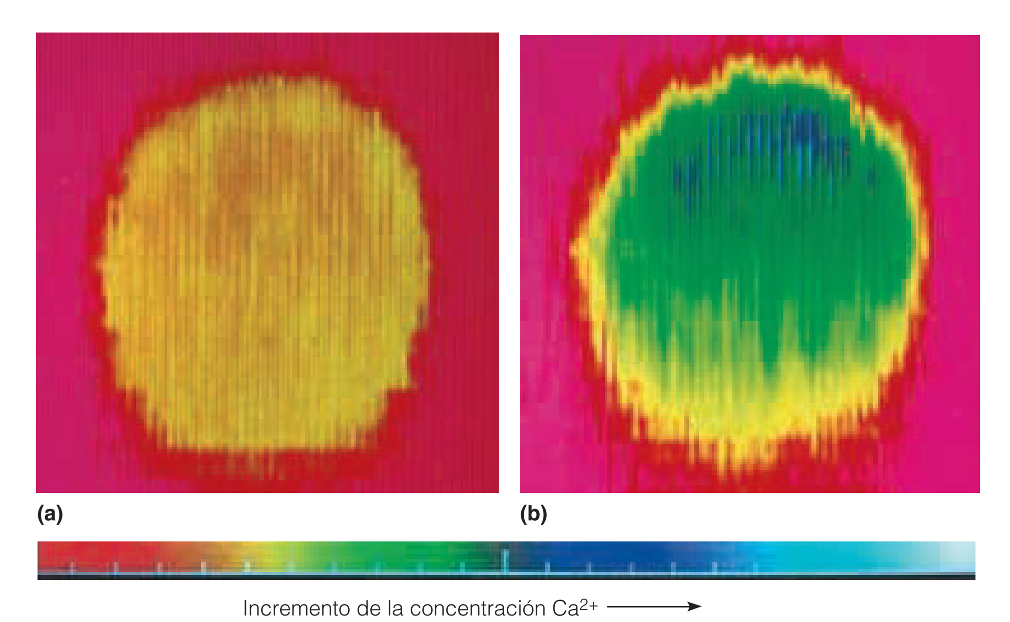


Figura 14.11 Incremento en la concentración libre citosólica de Ca2+ inducida por una hormona que estimula la formación de inositol trifosfato. Se llenaron células de la glándula adrenal bovina con fura-2, un colorante que emite fluorescencia cuando está unido al Ca^{2+}. El color de la fluorescencia cambia con las variaciones en la concentración de Ca^{2+}. (**a**) Micrografías de fluorescencia codificadas en color de una célula adrenal no estimulada para reflejar los distintos niveles de fluorescencia en respuesta a los niveles de Ca^{2+}. El color amarillo indica una concentración de Ca^{2+} libre relativamente baja. (**b**) Fluorescencia de la célula adrenal estimulada con angiotensina, una hormona que induce la formación de inositol trifosfato. Los colores verde y azul indican que existe un incremento en la concentración de Ca^{2+} libre.

Figura 14.12 Visión general de la regulación del calcio en las células. La concentración citosólica de calcio disminuye por la actividad de la ATPasa de calcio del ER, la ATPasa de calcio de la membrana plasmática, intercambiadores sodio calcio y las mitocondrias. La concentración de calcio se incrementa en el citosol debido a la apertura de canales de calcio en la membrana plasmática y la liberación de calcio a través de los canales de los receptores de IP_3 y rianodina en la membrana del ER.

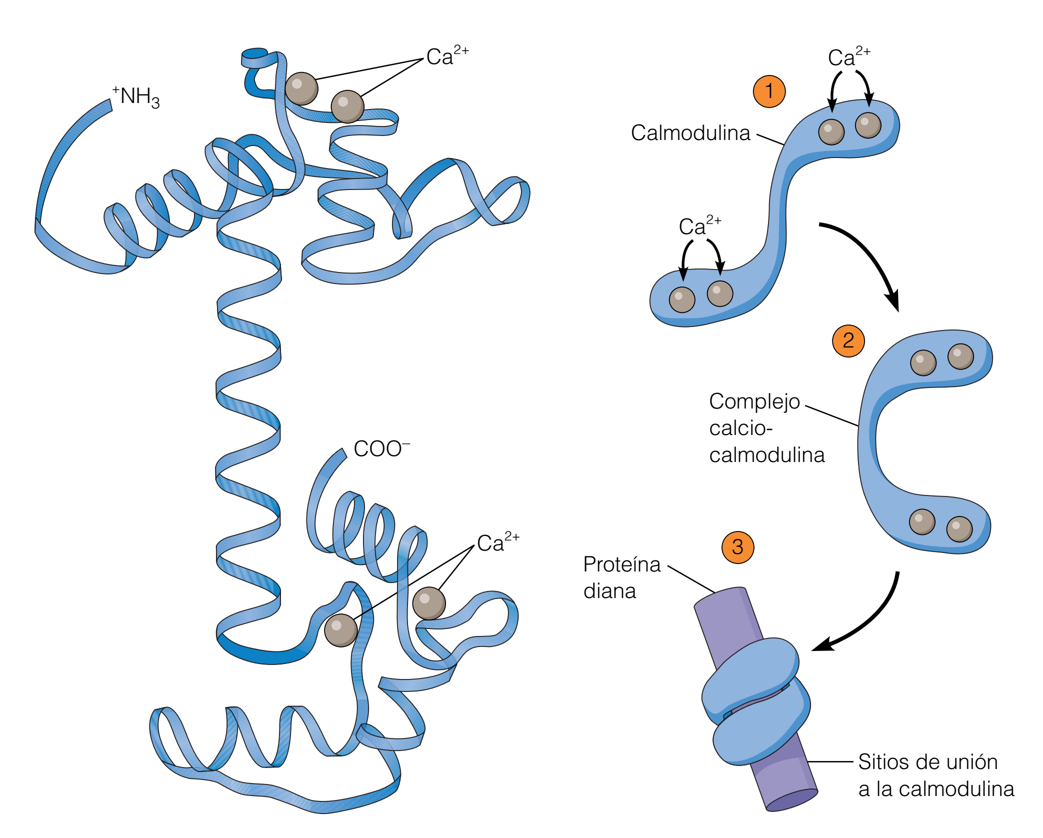
Existen diversas vías a través de las cuales distintos estímulos pueden producir el incremento de la concentración citosólica de calcio. En el Capítulo 13 tratamos una de estas vías en las neuronas, que consiste en la apertura de canales de calcio en la membrana plasmática. La concentración de calcio en el fluido extracelular y en la sangre es de alrededor de 1,2 m*M*, más de 10.000 veces más alta que en el citosol. Como consecuencia, cuando los canales de calcio se abren el calcio entra en la célula.

Los niveles de calcio se pueden elevar también por la liberación de calcio desde los reservorios intracelulares. Los iones de calcio secuestrados en el ER pueden ser liberados a través del canal del receptor de IP_3, comentado anteriormente, y a través del canal del receptor de rianodina. El *canal del receptor de rianodina*, llamado así ya que es sensible al alcaloide vegetal *rianodina*, es particularmente importante en la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico del músculo cardíaco y esquelético (Capítulo 16), pero las células no musculares como las neuronas también tienen canales de rianodina de liberación de calcio. Sorprendentemente, tanto el canal del receptor de rianodina como los receptores de IP_3 son sensibles al propio calcio. Por ejemplo, cuando una neurona es despolarizada, se abren canales de calcio en la membrana plasmática, lo que permite la entrada de algo de calcio al citosol. Ante la exposición a un rápido incremento de los iones calcio, el canal del receptor de rianodina se abre, lo que permite la salida de calcio desde el ER al citosol. Este fenómeno se ha llamado de manera acertada *liberación de calcio inducida por calcio.*

El complejo calcio-calmodulina y sus efectos intracelulares. El calcio se puede unir directamente a algunas proteínas y por lo tanto alterar su actividad, pero más a menudo funciona a través de la proteína **calmodulina**. Esta proteína desempeña un papel esencial en la regulación de diversos procesos celulares.

¿Cómo media la calmodulina en los procesos celulares activados por calcio? La molécula de calmodulina se ha comparado con un «brazo» flexible con una «mano» en cada extremo (Figura 14.13a). Se pueden unir dos iones calcio a cada uno de las dos regiones «mano», produciendo que la calmodulina sufra un cambio conformacional que constituye el *complejo calcio-calmodulina* activo (Figura 14.13b, pasos ① y ②). Cuando está presente alguna proteína que contiene un sitio de unión a la calmodulina, las manos y el brazo se unen a ella rodeando el sitio de unión (Figura 14.13b, paso ③).

Una de las características más importantes de la calmodulina es su afinidad por el calcio: la calmodulina se une al calcio cuando la concentración citosólica de calcio se incrementa hasta alrededor de 10^{-3} m*M*, pero libera calcio cuando los niveles citosólicos de calcio vuelven a su estado de reposo de 10^{-4} m*M*. Así, la calmodulina resulta especialmente apta para operar dentro del rango típico de las concentraciones citosólicas de calcio.



(a) Estructura del complejo Ca^{2+}-calmodulina

(b) Función del complejo Ca^{2+}-calmodulina

Figura 14.13 Estructura y función del complejo calcio-calmodulina. (**a**) La calmodulina es una proteína citosólica ligante de calcio. Este modelo de su estructura molecular está basado en datos de cristalografía de rayos X. La molécula está formada por dos extremos globulares («manos») unidos por una región helicoidal («brazo»). Cada extremo tiene dos sitios de unión a calcio. (**b**) Para formar un complejo calcio-calmodulina funcional, ① la calmodulina une cuatro iones calcio. ② La calmodulina cambia de conformación lo que produce la activación del complejo. ③ Las dos «manos» globulares del complejo rodean al sitio de unión a calmodiulina en la proteína diana.

La mayoría de las proteínas de unión a calmodulina son enzimas como kinasas y fosfatasas. La respuesta de una célula diana al incremento de la concentración de calcio depende de las proteínas de unión a calmodulina particulares que estén presentes en la célula. Esto significa que el mismo cambio en la concentración de calcio puede producir efectos marcadamente diferentes en dos células dianas, si cada una de ellas posee distintos sistemas de enzimas sensibles a calmodulina.

Liberación de calcio después de la fertilización de óvulos animales. La fertilización de los huevos animales es un ejemplo llamativo de la importancia de la transducción de señal mediada por calcio después de una interacción receptor-ligando. En muchos animales, una vez que los espermatozoides han sufrido diversos pasos previos de activación, se unen a la superficie de los óvulos maduros y se funden con ellos en el proceso fertilización que va seguido de una secuencia llamativa de efectos. Una de las respuestas tempranas del óvulo —entre 30 segundos y algunos minutos después de la fertilización— es la liberación de calcio de los reservorios internos. La liberación de calcio se produce inicialmente en el sitio de la superficie del óvulo por donde penetra el espermatozoide, y luego se extiende a lo largo del óvulo, de la misma forma que se extiende una onda en la superficie de una fuente desde el sitio en el que un guijarro golpea el agua. Esta propagación de la liberación de calcio como una onda se puede visualizar usando indicadores de calcio (Figura 14.14).

La liberación de calcio es necesaria para procesos cruciales. En primer lugar, estimula la fusión de vesículas, conocidas como *gránulos corticales*, con la membrana plasmática del óvulo, lo que produce la liberación de su contenido fuera de la célula (Figura 14.15). Los gránulos corticales contienen numerosas proteínas y enzimas, cuya liberación produce alteraciones en el recubrimiento proteico que rodea la mayoría de los óvulos (conocido típicamente como *envuelta vitelina*). Estas alteraciones hacen que el óvulo sea incapaz de unirse a otros espermatozoides, evitando por lo tanto que el óvulo sea fertilizado por más de un espermatozoide. Este proceso se conoce como el *bloqueo lento de la poliespermia.* (El *bloqueo rápido de la poliespermia* es anterior e implica la despolarización transitoria de la membrana plasmática del óvulo.)

La segunda función principal del calcio es la activación del huevo. La activación del huevo implica la reactivación

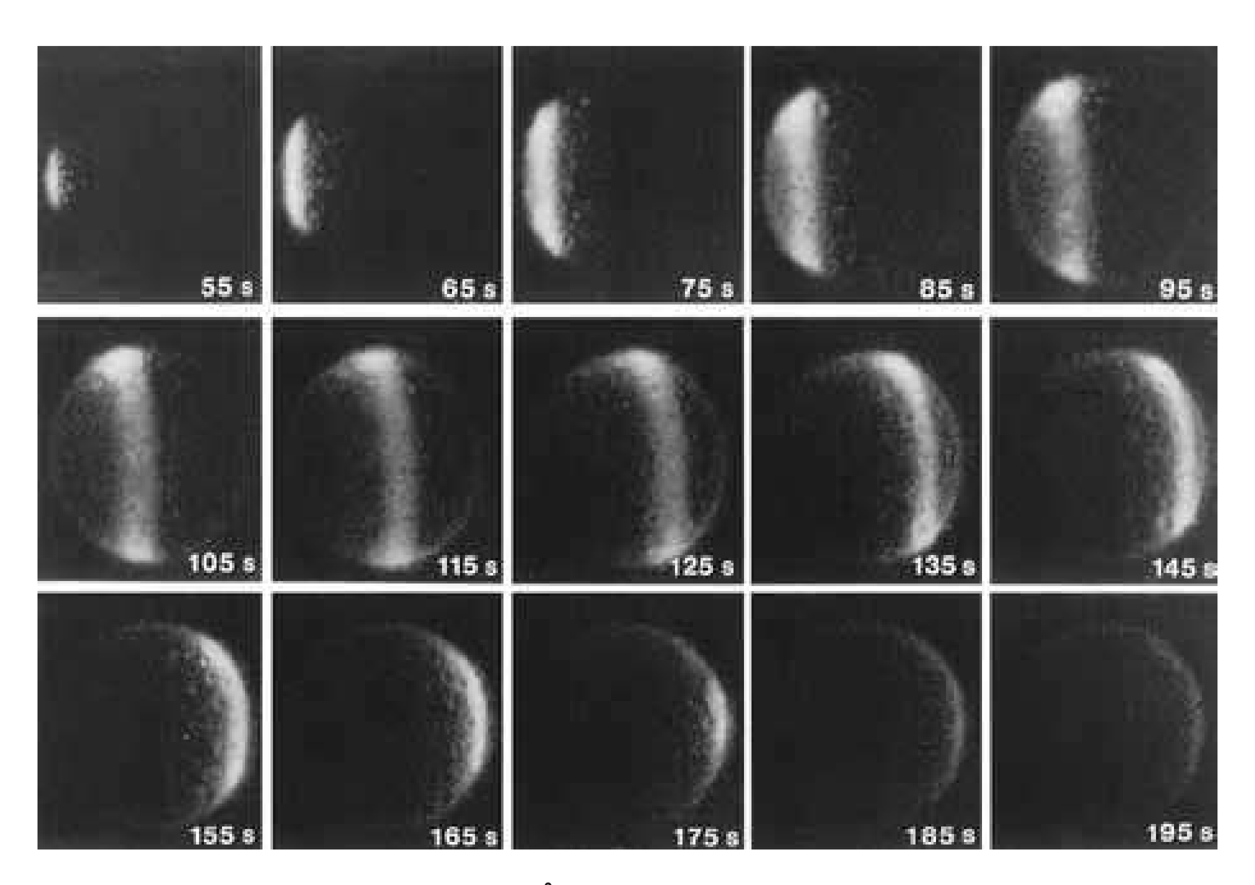


Figura 14.14 Incremento transitorio en la concentración de Ca^{2+} citosólica que se produce en un huevo inmediatamente después de la fertilización. En este experimento clásico, un huevo de pez se inyecta con acuoporina, un colorante que emite luz cuando se une al Ca^{2+} libre en el citosol. En cada fotografía se indica el tiempo después de la fertilización. Estas imágenes muestran que, en los primeros minutos después de la fertilización, se produce una onda transitoria con un incremento de la concentración de Ca^{2+} que pasa a través del óvulo, comenzando por el punto de entrada del espermatozoide a la izquierda.

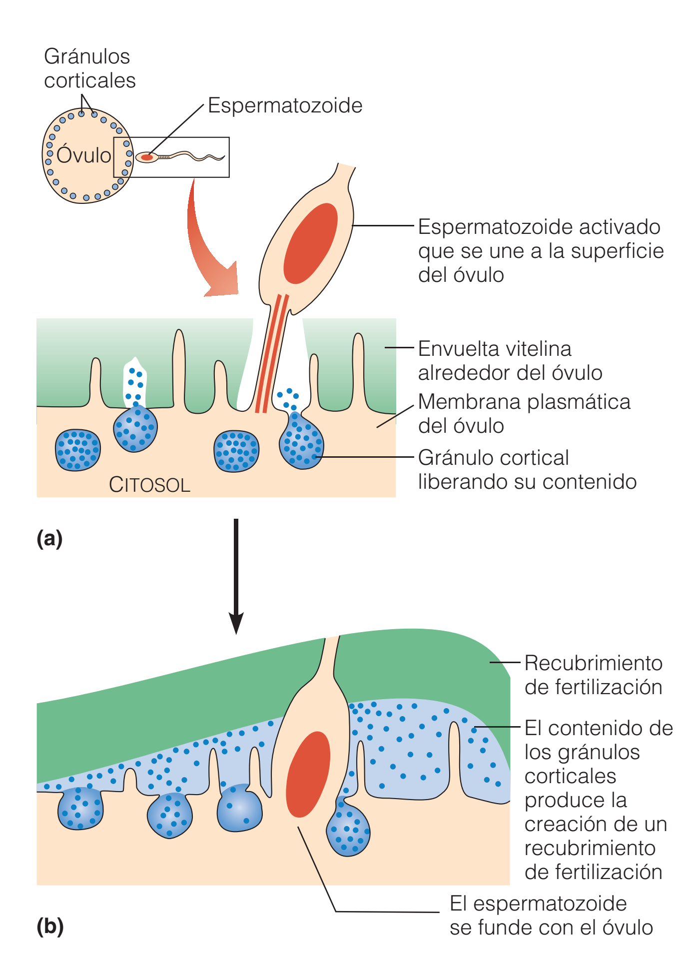


Figura 14.15 El papel del calcio en el bloqueo lento de la poliespermia en los erizos de mar. (**a**) Un espermatozoide que ha sido activado se une a la superficie del óvulo, lo que produce una liberación local de calcio y la exocitosis de los gránulos corticales. (**b**) El resultado es la creación de una envuelta de fertilización, que previene de la penetración de espermatozoides adicionales en el óvulo.

de muchos procesos metabólicos, la reorganización de los contenidos internos del huevo y otros eventos que inician el proceso del desarrollo embrionario. Muchas características del bloqueo lento de la poliespermia y de la activación del huevo se pueden iniciar tratando óvulos no fertilizados con un ionóforo de calcio en ausencia de espermatozoides, lo que demuestra el papel fundamental que desempeñan la elevación de los niveles de calcio dentro del óvulo.

La activación del huevo es un buen ejemplo de cómo un cambio dinámico en la concentración de calcio puede producir respuestas celulares dramáticas. En otros casos, lo que desencadena la respuesta celular es la *oscilación* de la concentración de calcio a lo largo del tiempo. Las oscilaciones de calcio se producen en neuronas y en los óvulos fertilizados de mamíferos, y pueden contribuir a producir cambios estables en el estado de estas células. Las oscilaciones de calcio son también importantes en la regulación de la apertura y de cierre de los estomas de las plantas.

El óxido nítrico acopla la activación de un receptor unido a proteína G en las células endoteliales a la relajación de células musculares lisas de los vasos sanguíneos

El **óxido nítrico (NO)**, una molécula de gas tóxico de vida corta producida por la enzima *NO sintasa* que convierte el aminoácido arginina en NO y citulina, es una molécula de señalización importante en sistema cardiovascular. El modo de acción del óxido nítrico en los vasos sanguíneos implica a las proteínas G.

Se conoce desde hace muchos años que la acetilcolina dilata los vasos sanguíneos, induciendo la relajación de su musculatura lisa. En 1980, Robert Furchgott demostró que la acetilcolina dilataba los vasos sanguíneos únicamente si el *endotelio* (el recubrimiento interno que los vasos sanguíneos) estaba intacto. Él concluyó que los vasos sanguíneos se dilatan debido a que las células endoteliales producen una molécula de señalización (o *vasodilatador*) que hace que las células de la musculatura lisa se relajen. En 1986, el trabajo de Furchgott, y el trabajo paralelo de Louis Ignarro identificaron al NO como la señal liberada por las células endoteliales que produce la relajación de la musculatura lisa de los vasos.

La Figura 14.16 ilustra cómo la unión de la acetilcolina a la superficie de las células endoteliales vasculares produce la liberación de NO. Hay seis pasos en este proceso. ① La acetilcolina se une a receptores acoplados a proteínas G que activan la vía de señalización de los fosfoinisítidos, causando la producción de IP_3 por las células endoteliales. ② El IP_3 induce que se libere calcio desde el retículo endoplásmico. ③ Los iones calcio se unen a la calmodulina, formando un complejo que estimula a la sintasa de NO para producir óxido nítrico. ④ El óxido nítrico es un gas que difunde a través de las membranas plasmáticas, permitiendo su paso desde las células endoteliales a las células musculares lisas adyacentes. ⑤ Una vez dentro de las células musculares lisas, el NO activa a la enzima *guanilato ciclasa*, que cataliza la formación de *GMP cíclico* (cGMP). El GMP cíclico deriva del GTP, de forma análoga a la producción de cAMP a partir de ATP, y, al igual que el cAMP, el cGMP puede actuar como mensajero secundario. ⑥ El incremento en la concentración de cGMP activa la proteína conocida como *proteína kinasa G*, que induce la relajación muscular al catalizar la fosforilación de proteínas musculares apropiadas.

El mecanismo por el cual la estimulación del acetilcolina de las células endoteliales conduce a la relajación de la musculatura lisa también explica el mecanismo de acción de la sustancia *nitroglicerina*. La nitroglicerina es administrada a menudo a pacientes con angina de pecho (dolor de pecho debido al flujo sanguíneo inadecuado hacia el corazón) para eliminar la contracción de las arterias coronarias. En 1977, Ferid Murad descubrió que la nitroglicerina y algunos vasodilatadores semejantes producen en la liberación de óxido nítrico, el cual relaja las células musculares lisas de las arterias. En 1998, Furchott, Ignarro y Murad

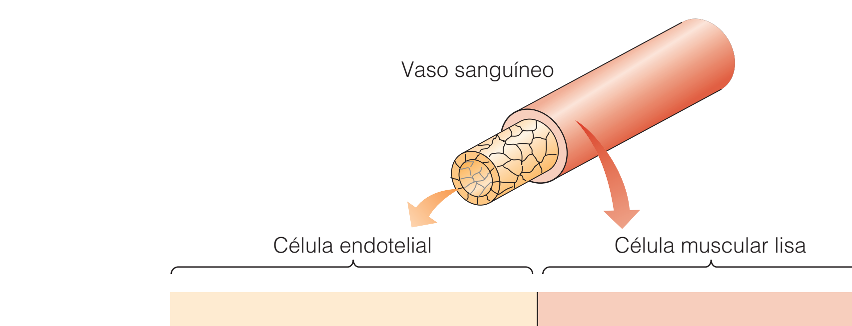


Figura 14.16 Acción del óxido nítrico en los vasos sanguíneos. La unión de acetilcolina a las células endoteliales induce la producción de óxido nítrico, que difunde a las células musculares lisas adyacentes y estimula a la guanilato ciclasa, produciendo por lo tanto la relajación muscular.

recibieron el Premio Nobel por su descubrimiento de los efectos del NO en el sistema cardiovascular.

El óxido nítrico también es empleado por las neuronas para emitir señales a las células vecinas. Por ejemplo, la liberación de óxido nítrico por las neuronas del pene produce la dilatación de los vasos sanguíneos responsables de la erección del pene. El compuesto *sildenafil*, comercializado con el nombre de Viagra, es un inhibidor de una fosfodiesterasa que normalmente cataliza la hidrólisis del GMP cíclico. Manteniendo elevados los niveles de GMP cíclico en el tejido eréctil se estimula esta vía por un periodo más largo después de la liberación de NO.

Receptores asociados a proteínas kinasa

Hemos visto cómo los receptores acoplados a proteínas G transmiten su señales hacia el interior de la célula produciendo cambios en una proteína G que, como consecuencia, inicia una cascada de procesos de transducción de señal. Estos eventos pueden incluir la producción de AMP cíclico, la producción de IP$_3$ y la liberación de calcio. Otra familia de proteínas usa una estrategia diferente para transmitir sus señales. Éstas no sólo funcionan como receptores sino que también son proteínas kinasa. Cuando se unen al ligando apropiado, se estimula su actividad kinasa, y transmiten señales a través de una cascada de eventos de fosforilación dentro de la célula.

Recuerde que las kinasas añaden grupos fosfato a aminoácidos particulares de las proteínas sustrato (Capítulo 6). Los receptores acoplados a kinasas a menudo se clasifican en dos categorías principales: aquellos que fosforilan a un residuo de tirosina (tirosina kinasa) y aquellos que fosforilan a un residuo de serina o treonina (serina/treonina kinasa). Examinaremos ahora estos receptores proteína kinasa en detalle, usando como ejemplo principal a los receptores tirosina kinasa, un tipo de estos receptores bien estudiado.

Los receptores tirosina kinasa se agregan y se autofosforilan

Muchos **receptores tirosina kinasa (RTKs)** desencadenan una sucesión de eventos de transducción de señal dentro de la célula que finalmente conduce al crecimiento celular, o la proliferación y especialización de las células en un proceso

conocido como diferenciación. Estos procesos están controlados estrechamente, de forma que sólo responden células específicas cuando está disponible un ligando apropiado. Entre los ejemplos de RTKs se incluyen el receptor de la insulina, el receptor del factor de crecimiento nervioso y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Figura 14.17).

Estructura de los receptores tirosina kinasa. Los receptores tirosina kinasa difieren estructuralmente de los receptores acoplados a proteínas G en muchos aspectos. Estos receptores a menudo están formados por una única cadena polipeptídica con un único segmento transmembrana. Existen diversos dominios diferentes dentro de esta cadena polipeptídica (Figura 14.17a). La porción extracelular del receptor contiene el *dominio de unión al ligando*. El otro extremo del péptido sobresale desde la membrana plasmática hacia el citosol. En la cara citosólica, una porción del receptor forma la tirosina kinasa, mientras que el resto constituye la cola citosólica. La porción citosólica del receptor contiene residuos de tirosina, que son de hecho sustratos o dianas de la porción tirosina kinasa del receptor.

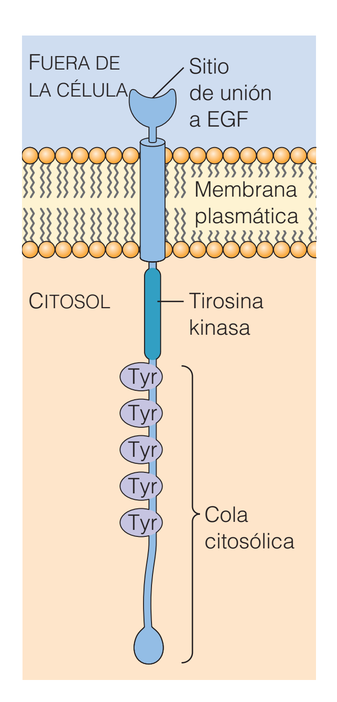
La tirosina kinasa frecuentemente es una parte integral de la proteína receptora. Sin embargo, en algunos casos el receptor y la tirosina kinasa son dos proteínas separadas, y la tirosina kinasa entonces se denomina *tirosina kinasa no receptora*. Sin embargo, se puede unir al receptor y ser activada cuando el receptor se une a su ligando de forma que el efecto neto es muy similar a la activación de un receptor tirosina kinasa típico.

Las tirosina kinasas no receptoras fueron las primeras tirosina kinasas que se descubrieron. La primera tirosina kinasa no receptora identificada fue la proteína Src, codificada por el gen src del virus del sarcoma de las aves. Desde entonces, se han descubierto muchas tirosina kinasas no receptoras, la mayor parte de las cuales tienen una estructura semejante a la de la proteína Src.

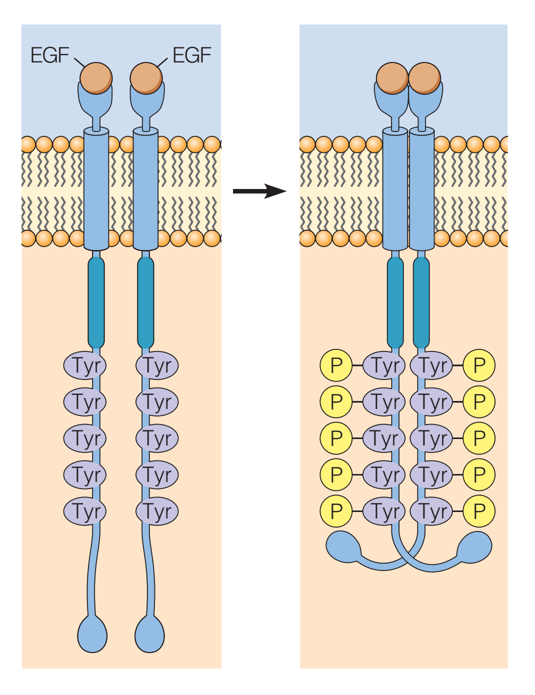
Activación de los receptores tirosina kinasa. La transducción de señal se inicia cuando se une un ligando, produciendo la agregación de los receptores tirosina kinasa (Figura 14.17b). En muchos de los casos mejor entendidos, dos moléculas de receptor cuando se une en ligando se asocian en la membrana plasmática. Una vez que los receptores se unen de esta forma, la tirosina kinasa asociada a cada receptor fosforila las tirosinas de los receptores vecinos. Ya que los receptores fosforilan a otros receptores del mismo tipo, nos referimos a este proceso como **autofosforilación**.

Los receptores tirosina kinasa inician una cascada de transducción de señal que implica a Ras y MAP kinasa

Los receptores tirosina kinasa usan un método diferente de iniciación de la transducción de señal de lo que hemos visto para los receptores acoplados a proteínas G. Muchos de los principales eventos en la señalización de los RTK fueron identificados empleando mutantes de organismos modelo como *Drosophila* y *Caenorhabditis elegans*, lo que describimos en el Anexo 14A. Aquí presentamos una visión general de esta importante vía.



(a) Estructura del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF)



(b) Activación del receptor de EGF

Figura 14.17 Estructura y activación de un receptor tirosina kinasa. (**a**) El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), mostrado aquí, es un ejemplo de los muchos receptores tirosina kinasa. Estos receptores a menudo tienen un único segmento transmembrana. La porción extracelular del receptor se une al ligando (en este caso EGF). Dentro de la célula, una porción del receptor tiene actividad tirosina kinasa. El resto del receptor contiene una serie de residuos de tirosina que son sustratos para la tirosina kinasa. (**b**) La activación de los receptores tirosina kinasa comienza con la unión de un mensajero (EGF en este caso), produciendo la agregación de receptores. Una vez que estos receptores se agregan, se fosforilan recíprocamente en distintos residuos del aminoácido tirosina. La formación de residuos tirosina fosfato (Tyr-P) en el receptor produce sitios de unión para proteínas citosólicas que contienen dominios SH2.

Utilización de modelos genéticos para estudiar la señalización celular

Los biólogos celulares modernos utilizan diversas herramientas experimentales para estudiar eventos clave en biología celular, que incluyen bioquímica y fraccionamiento celular (Capítulo 12), microscopía óptica y electrónica (*véase* el Apéndice) y las herramientas de la biología celular moderna (*véanse* Capítulos 18 y 21). Además, el análisis genético de mutantes, que muestran defectos durante procesos de señalización específicos, ha permitido descubrimientos clave en las vías de señalización. La utilización de estos *modelos genéticos* incluyendo la levadura *Saccharomices cerevisiae*, el nematodo *Caenorhabditis elegans* y la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, ha revolucionado nuestra capacidad para asociar las funciones de proteínas específicas con vías importantes de señalización. Por ejemplo, los estudios con levaduras han identificado mutantes con efectos en el ciclo celular que proporcionan información clave con respecto a cómo se controla el ciclo. Examinaremos la regulación del ciclo celular en el Capítulo 19. Aquí, nos centraremos en cómo los modelos genéticos nos han hecho descubrir proteínas clave que regulan dos vías de señalización: la vía del receptor tirosina kinasa (RTK) y la apoptosis.

Señalización a través de receptores tirosina kinasa y el ojo de la mosca

El análisis genético de la transducción de señal a después de activar a RTKs se llevó a cabo de manera simultánea en dos sistemas: el ojo compuesto de *Drosophila* y en las estructuras que cubren al huevo o vulva, del nematodo *C. elegans*. Consideraremos ahora cómo se empleó el ojo de *Drosophila* para identificar componentes de la señalización celular.

El ojo compuesto de *Drosophila* está formado aproximadamente por 800 «ojos» individuales llamados «omatidios» (Figura 14A.1a). Cada omatidio está formado por 22 células. Ocho de estas células son fotorreceptores y se nombran en base a su posición (R1-R8; Figura 14A.1c y d). Una mutación en un RTK conocida como *sevenless* (abreviada como *sev*) produce la pérdida de la célula R7, que se diferencia como un cono (Figura 14 A.1e). Estudios posteriores han identificado un ligando de la superficie celular en la célula vecina R8, que activa el receptor de *sevenless.* Se llamó *novia del sevenless* (abreviado como Boss). La proteína Boss de R8 se une al receptor de Sev en R7, iniciando la vía de señalización.

Para identificar componentes adicionales de la vía de *sev,* se encontraron condiciones en las que estaba presente la cantidad suficiente de receptores Sev para permitir el desarrollo de R7 (estas condiciones se denominan «medio sensibilizado» por los genetistas). Se aislaron entonces mutaciones en las que los defectos de ojos se producían únicamente cuando las moscas también portaban este defecto de sensibilidad en Sev (*véase* Figura 14A.2). Los investigadores hicieron el razonamiento de que estas mutaciones podrían afectar la misma vía que activa Sev/Boss. Usando esta aproximación, se identificaron diversos componentes importantes de la señalización por RTK. Estos

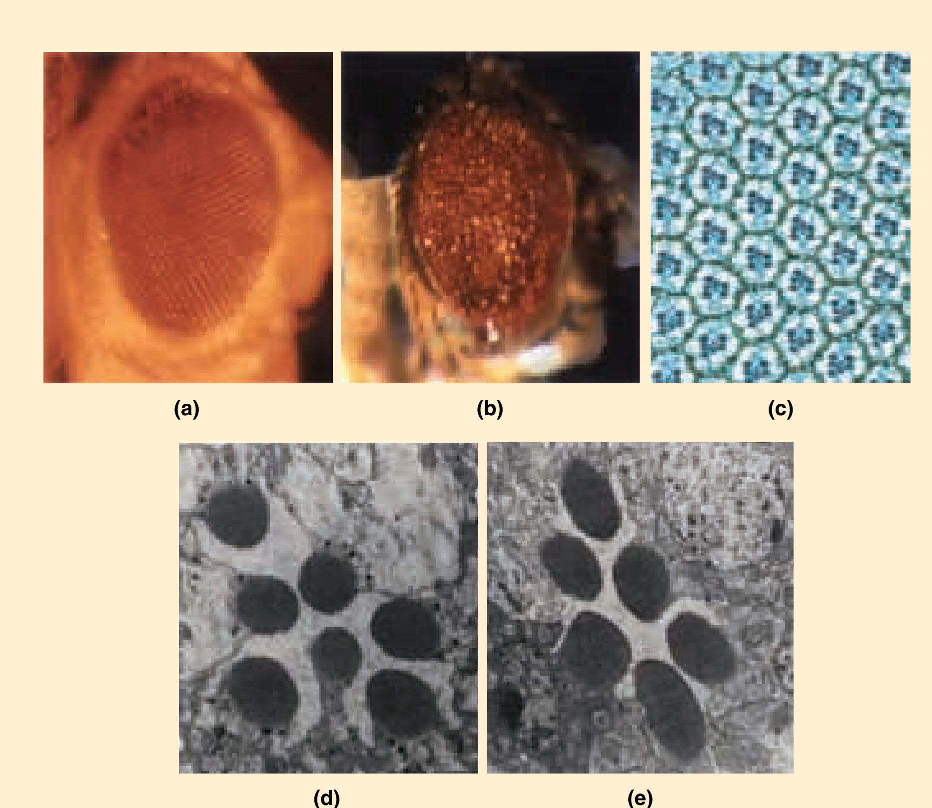


Figura 14A.1 El ojo compuesto de *Drosophila*. (**a**) Un ojo normal (micrografía óptica). (**b**) Un ojo que expresa una forma activada dominante de Ras parece rugoso. (**c**) Sección transversal a través de un ojo normal que muestra la organización repetitiva de omatidios que capturan y perciben la luz. Los puntos morados centrales en cada omatidio son células fotorreceptoras. El pequeño punto en el centro es una célula R7. (**d**) Sección transversal de un omatidio normal a muchos aumentos (TEM). La célula R7 está en el centro. (**e**) En el mutante *sevenless*, que no expresa el RTK necesario para que R7 se diferencie adecuadamente, R7 no está presente.

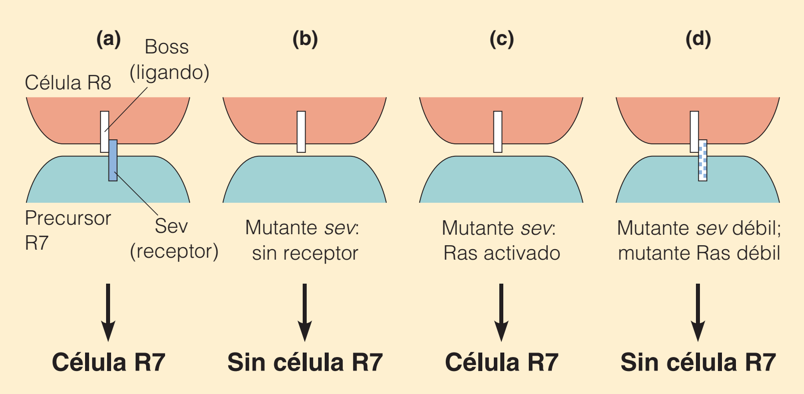


Figura 14A.2 Las mutaciones en la vía de Ras pueden o bien pasar por alto o bien incrementar los defectos en la señalización por RTK. (**a**) En una larva normal, el ligando de Boss en la superficie de la célula R8 activa el receptor Sev de la célula precursora adyacente R7, lo que conduce a su diferenciación normal. (**b**) En los mutantes Sev, la falta del receptor Sev produce un fallo en la recepción de la señal de la célula R8 en el precusor la célula R7, y el precursor no se transforma en una célula R7. (**c**) Cuando la mosca carece de proteína Sev funcional, pero la célula R7 expresa una forma activa dominante de Ras, la célula R7 se puede formar. (**d**) Cuando Sev contiene una mutación débil, que normalmente permite la formación de la célula R7, pero el precursor R7 también tiene una mutación débil en Ras, no se produce célula R7.

estudios pioneros, conjuntamente con estudios bioquímicos de células en cultivo, mostraron que estas proteínas no solamente son importantes, sino que eran esenciales para que se produzca la señalización a través de RTK.

En otros estudios, se examinaron los efectos de mutaciones múltiples en la vía de Sev. Por ejemplo, cuando se hace un doble mutante que carece de Sevenless funcional, pero también tiene una mutación dominante en Ras que reduce su actividad GTPasa (esta mutación hace que Ras sea *activo constitutivamente*, es decir, está sobreestimulado), R7 se diferencia aunque no puede recibir la señal de R8 (Figura 14A.1b). Esto proporciona la evidencia de que la vía de Sev normalmente funciona mediante la activación de Ras. Cuando Ras se activa a sí mismo ya no son necesarios los eventos de la superficie celular. Mediante éste y otros estudios similares en *C. elegans,* se clarificaron las vías de señalización posteriores a la señalización a través de RTK.

Apoptosis en *C. elegans*

C. elegans es un organismo indicado especialmente para estudiar el proceso de muerte celular. Su ciclo de vida es muy corto, es ópticamente transparente, y sus embriones se desarrollan de manera muy consistente. De hecho, son tan constantes que el linaje de cada célula en el animal adulto se conoce con una precisión completa. Esto significa que la secuencia de divisiones celulares que genera cada una de las 1.090 células producidas durante el desarrollo se puede trazar hacia atrás, hasta el estado unicelular de huevo fecundado, una hazaña que se consiguió en gran medida a partir del trabajo de John Sulston en el Medical Research Council de Cambridge, Inglaterra. Sulston demostró también que 131 células experimentan muerte celular programada en un tiempo muy concreto durante el desarrollo embrionario normal de *C. elegans.* A partir de los estudios de Roberts Horvitz y sus colaboradores en el Massachusetts Institute of Technology, se identificaron numerosos mutantes con defectos en algunos aspectos de la muerte celular, llamados mutantes *ced* (del inglés *cell death defective* que se puede traducir como *muerte celular defectuosa*), y se caracterizaron los genes asociados con estas mutaciones. Por ejemplo, los cadáveres de las células muertas normalmente son destruidos —comidos literalmente mediante fagocitosis— por otras células. Horvitz y sus colaboradores identificaron numerosas mutaciones que bloquean la fagocitosis de las células muertas, de forma que sus cadáveres persisten, permitiendo su fácil visualización con el microscopio óptico (Figura 14A.3). Usando estos mutantes, es posible buscar otras mutaciones que eviten la muerte celular, de forma que hubiese pocos o ningún cadáver. Uno de los primeros genes en ser caracterizados a nivel molecular fue el gen *ced-3*, que codifica para un miembro de la familia de proteínas *caspasas*, enzimas clave en la secuencia de procesos que desencadenan apoptosis (Figura 14.26). Otro gen *ced, ced-9*, codifica la versión de *Bcl-2* en *C. elegans*, una proteína que desempeña un papel fundamental en la regulación de la salida de moléculas de las mitocondrias que pueden desencadenar apoptosis. Examinando los animales portadores de mutaciones en más de uno de los genes *ced*, Horvitz y sus colaboradores fueron capaces de determinar en qué paso de la apoptosis actúan las proteínas codificadas por los genes *ced.* De manera conjunta con estudios procedentes de células en cultivo, realizados aproximadamente al mismo tiempo, el trabajo de Horvitz y sus colaboradores proporcionó descubrimientos clave en la apoptosis. Por ese trabajo, y por sus trabajos sobre la señalización celular en la vulva, Horvitz, junto con Sulston y el genetista Sydney Brenner, compartieron el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 2002.



Figura 14A.3 Muerte celular en *C. elegans*. Embriones silvestres [arriba] y mutantes *ced-1* [abajo] (Microscopía DIC). Aunque se pueden observar células muertas en los dos embriones como pequeños «botones» estos cadáveres celulares solamente se acumulan en el embrión *ced-1*, debido a que falla la fagocitosis de las células muertas (flechas).

Una vez que se produce la autofosforilación de los residuos de tirosina en la porción citosólica del receptor, como respuesta a la unión del ligando (① y ②, Figura 14.18), el receptor recluta diversas proteínas citosólicas para interaccionar con ellas. Cada una de esas proteínas se une al receptor en un residuo de tirosina fosforilado. Para unirse al receptor, cada proteína citosólica debe contener un dominio de aminoácidos que reconozca la fosfotirosina, y algunos aminoácidos vecinos en el receptor. La porción de la proteína que reconoce una tirosina fosforilada se denomina **dominio SH2**. El término *SH2*, que indica dominio 2 de homología a Src, se usó originalmente porque las proteínas con dominios SH2 tienen secuencias de aminoácidos que son sorprendentemente similares a una porción de la proteína Src.

El reclutamiento de distintas proteínas que contienen dominios SH2 activan vías de transducción de señal diferentes. Como resultado, los receptores tirosina kinasa pueden activar diversas vías de transducción de señal al mismo tiempo. Éstas incluyen la vía de segundos mensajeros inositol-fosfolípidos-calcio, que ya hemos estudiado, y la vía de Ras, que finalmente activa la expresión de genes implicados en el crecimiento o el desarrollo.

Como veremos en el Capítulo 19, **Ras** es importante la regulación del crecimiento de las células. Al contrario que las proteínas G heterotriméricas asociadas con receptores acoplados a proteínas G, Ras está formado por una única subunidad. Ras, y otras *proteínas G monoméricas pequeñas,* son moléculas de señalización importantes. Al igual que otros tipos de proteínas G, Ras puede estar unida tanto a GDP como a GTP, pero solamente se activa cuando está unida a GTP. Cuando no se estimula al receptor, normalmente Ras está unida a GDP. Para que Ras se active, debe liberar GDP y adquirir una molécula de GTP. Para que esto se produzca, Ras necesita la ayuda de otro tipo de proteína llamada **factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF).**

El GEF que activa a Ras es **Sos** (llamado así porque fue identificado originariamente a partir de una mutación de

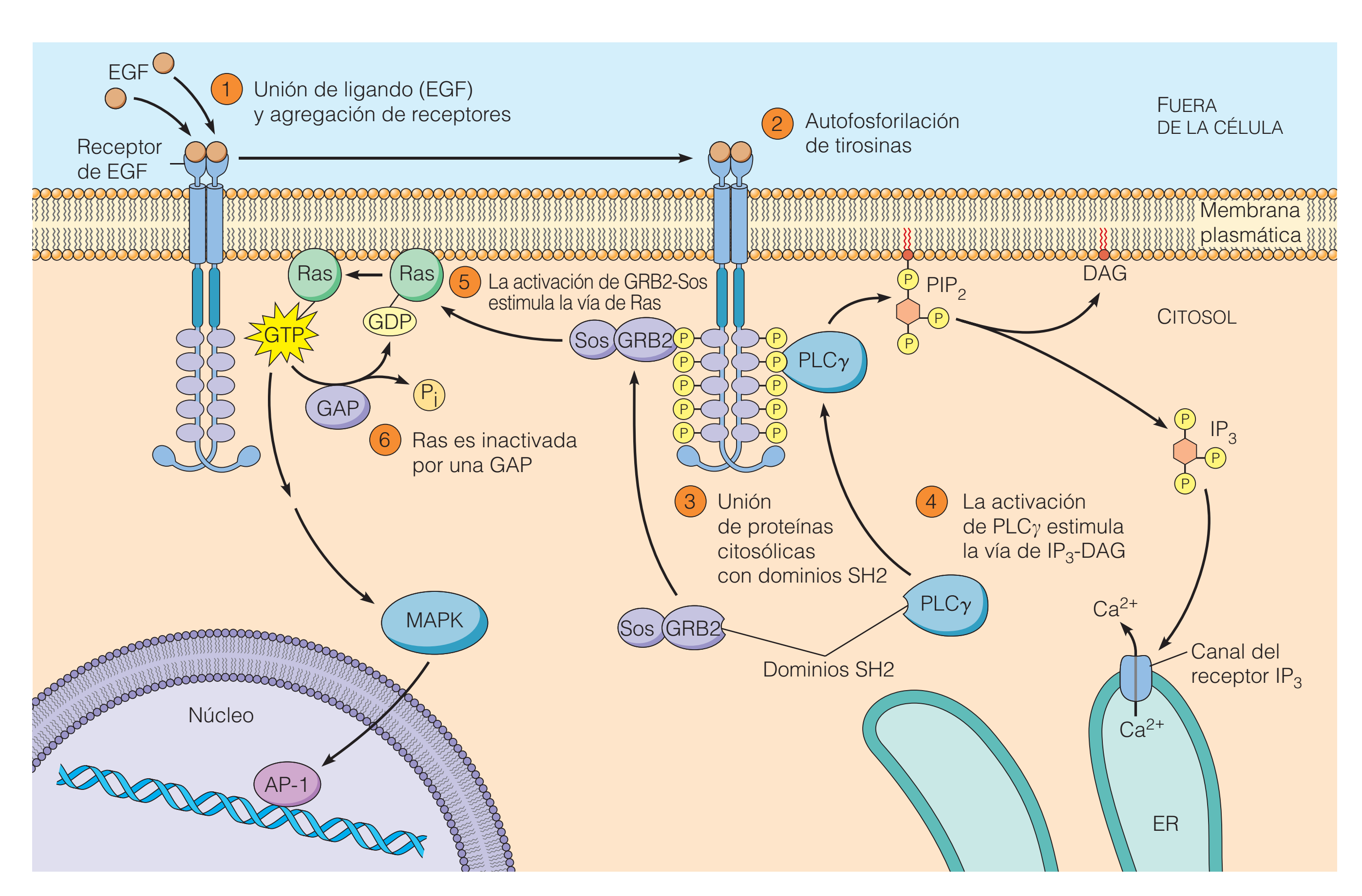


Figura 14.18 **Transducción de señal a través del receptores tirosina kinasa.** ① Después de la unión del ligando, los receptores tirosina kinasa como el que se muestra aquí para el factor de crecimiento epidérmico (EGF) se agregan y ② se autofosforilan. Una vez que el receptor se ha fosforilado en los residuos tirosina de su cola citosólica, ③ las proteínas condominios SH2, como la fosfolipasa C (PLC) y GRB2 se unen al receptor. ④ La unión de fosfolipasa C conduce a su activación y a la hidrólisis de PIP_2 para producir IP_3 y DAG. ⑤ La unión de GRB2 produce el activación de Sos, al que está unido. Sos (un GEF) entonces produce la activación de la proteína Ras ayudando a la liberación de GDP y a que adquiera GTP. Ras activada inicia una cascada de procesos que conduce en último lugar a la formación de AP-1, un factor de transcripción que estimula en el núcleo la expresión de genes necesarios para el crecimiento celular. ⑥ Ras es inactivado por la hidrólisis del GTP que tiene unido, un paso facilitado por GAP.

las moscas de la fruta llamada en inglés *Son of Sevenless*, que produce un fallo en el desarrollo correcto de las células del ojo compuesto; *véase* el Anexo 14A). Para que Sos se active, se debe unir indirectamente al receptor tirosina kinasa a través de otra proteína llamada *GRB2* (③, Figura 14.18) que contiene un dominio SH2. Así, para activar a Ras, el receptor se fosforila en las tirosinas, y GRB2 y Sos forman un complejo que se une al receptor, activando a Sos. Sos entonces estimula a Ras para liberar GDP y adquirir GTP, lo que transforma a Ras a su estado activo.

Una vez que Ras está activa, desencadena una cascada de procesos celulares llamados conjuntamente como vía de Ras (⑤ Figura 14.18). La activación de proteínas **kinasa activadas por mitógenos** o **kinasas MAP (MAPKs)** es un proceso importante de la vía. MAPKs son activadas cuando las células reciben un estímulo para crecer y dividirse (esta señal a veces se llama un *mitógeno*, de ahí el nombre de la kinasa). Una de las funciones de MAPKs es fosforilar a una proteína nuclear llamada *Jun*. Cuando Jun se fosforila, se une a otras proteínas para formar un factor de transcripción llamado *AP-1*, que parece estimular la producción de proteínas necesarias para que las células crezcan y se dividan. (Veremos cómo funcionan exactamente los factores de transcripción en los Capítulos 21 y 23.)

Una vez que Ras está en su estado activo, debe ser inactivado por la hidrólisis del GTP que tiene unido para evitar la estimulación continuada de la vía Ras. La hidrólisis del GTP es facilitada por una **proteína activadora de GTPasa (GAP).** Las GAPs pueden acelerar más de 100 veces la inactivación de Ras.

Los receptores tirosina kinasa activan diversas vías de señalización

Los receptores tirosina kinasa, al igual que los receptores acoplados a proteínas G, pueden activar también a la fosfolipasa C (④, Figura 14.18). Hemos visto que la activación de la fosfolipasa C conduce a la producción de IP_3 y DAG, y que IP_3 libera calcio de los reservorios intracelulares. Sin embargo, la fosfolipasa C_γ (activada por receptores tirosina kinasa) es diferente de la fosfolipasa C_β (activada por receptores acoplados a proteínas G), ya que contiene un dominio SH2 y se debe unir al receptor. Una vez que se une al receptor, la fosfolipasa C_γ es fosforilada por el receptor tirosina kinasa y se activa.

Además, los receptores tirosina kinasa pueden activar otras enzimas, como la *fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K)*, que fosforila el fosfolípido de membrana plasmática fosfatidilinositol. Esta enzima es importante en la regulación del crecimiento y del movimiento celular a través de su acción sobre varios fosfoinosítidos. Las funciones de esta kinasa son diversas, y en la red de procesos de señalización mediados por estos otros derivados de inositol dentro de la célula son complejos. Examinaremos el papel de PI3K con más detalle en el Capítulo 19.

Los factores de crecimiento como mensajeros

Las vías que hemos examinado son importantes en muchos procesos celulares. El crecimiento celular es un caso bien estudiado en el que intervienen.

Para que una célula crezca debe tener los nutrientes necesarios para la síntesis de sus componentes, pero la disponibilidad de nutrientes no es normalmente suficiente para el crecimiento. Las células a menudo también necesitan mensajeros que actúan sobre receptores específicos para estimular el crecimiento celular. Los biólogos descubrieron inicialmente los requerimientos para el crecimiento celular cuando intentaron cultivar células in vitro. Las células no crecían aunque se les suministraran un medio de crecimiento rico nutrientes y que incluía la presencia de plasma sanguíneo. Esto cambió cuando se empleó suero sanguíneo en lugar de plasma: el suero era capaz de inducir el crecimiento de las células, mientras que plasma no. Muchos de los mensajeros presentes en el suero han sido ahora purificados y son miembros de varias clases de proteínas conocidas como **factores de crecimiento**.

La diferencia entre suero sanguíneo y plasma sanguíneo radica en una cuestión importante acerca de los factores de crecimiento. El *plasma* es la sangre completa incluyendo a las plaquetas que no han reaccionado (que contienen componentes de la coagulación) pero sin células de las series roja y blanca. El *suero* es el fluido claro que permanece después de que la sangre se ha coagulado. Durante la coagulación, las plaquetas secretan factores de crecimiento a la sangre que estimulan el crecimiento de células llamadas *fibroblastos*, que generan el tejido conjuntivo necesario para desarrollar una cicatriz justo después de la coagulación. Por lo tanto, el suero está lleno de *factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)*. El plasma no contiene este factor porque la reacción de coagulación no ha tenido lugar.

Sabemos ahora que el receptor para PDGF es un receptor tirosina kinasa. De hecho, numerosos factores de crecimiento actúan mediante la estimulación de receptores tirosina kinasa, incluyendo a la *insulina*, el *factor-1 de crecimiento de la insulina*, el *factor de crecimiento fibroblástico*, el *factor de crecimiento epidérmico* y el *factor de crecimiento nervioso*. Más adelante examinaremos con cierto detalle sus mecanismos de acción. Se han aislado muchos otros tipos de factores de crecimiento. La Tabla 14.2 recoge una pequeña muestra que incluye algunos de los tipos celulares afectados por cada factor y la clase principal de molécula que sirve como receptor para cada factor.

Aunque colectivamente se conocen como factores de crecimiento, las proteínas que activan a los receptores tirosina kinasa y otros tipos de receptores intervienen en muchos procesos diversos. Entre ellos se incluyen, no solamente el crecimiento y la división celular, sino también procesos cruciales del desarrollo de los embriones, respuestas

Tabla 14.2 Ejemplos de familias de factores de crecimiento

Factor de crecimiento	Células diana	Tipo de complejo receptor
Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	Amplia variedad de células epiteliales y mesenquimales	Tirosina kinasa
Factor-α de crecimiento transformante (TGFα)	Igual que a EGF	Tirosina kinasa
Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)	Mesénquima, músculo liso, trofoblasto	Tirosina kinasa
Factor-β de crecimiento transformante (TGFβ)	Células fibroblásticas	Serina-treonina kinasa
Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)	Mesénquima, fibroblastos y muchos otros tipos celulares	Tirosina kinasa
Interleucina-2 (IL-2)	Linfocitos T citotóxicos	Complejo de tres subunidades
Factor-1 estimulante de colonias (CSF-1)	Precursores de macrófagos	Tirosina kinasa
Wnts	Muchos tipos de células embrionarias	Proteína de siete pasos transmembrana

a la lesión tisular y muchas otras actividades. Examinaremos los efectos de los factores de crecimiento sobre la división celular en el Capítulo 19 y su papel en el cáncer en el Capítulo 24. Por el momento, todo lo que necesitamos es saber que los factores de crecimiento son moléculas secretadas que actúan sobre su entorno y que tienen efectos específicos en las células que poseen el receptor apropiado para detectar la presencia del factor de crecimiento.

La interrupción de la señalización de los factores de crecimiento a través de los receptores tirosina kinasa puede tener efectos dramáticos en el desarrollo embrionario

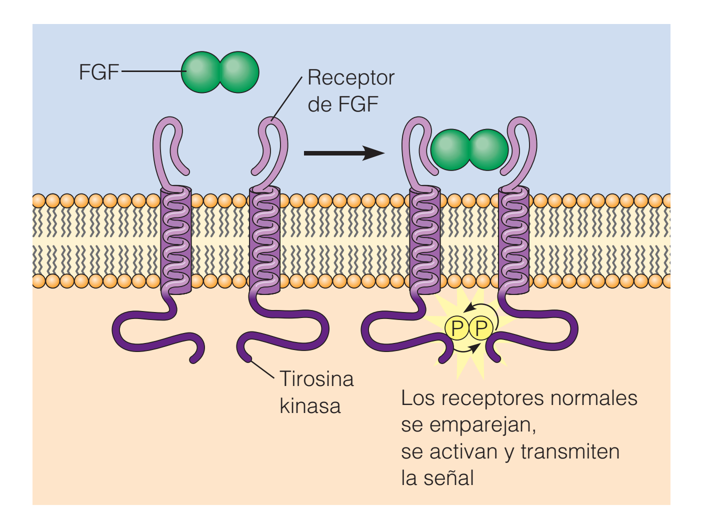
Muchos receptores para factores de crecimiento son receptores tirosina kinasa, que se clasifican en dos familias en base al factor o factores de crecimiento a los que se unen. Los **factores de crecimiento fibroblásticos (FGFs)** y sus receptores tirosina kinasa, los **receptores del factor de crecimiento fibroblástico (FGFRs)** constituyen una clase bien estudiada de factores de crecimiento y receptores. FGFs y FGFRs se emplean en procesos de señalización tanto en animales adultos como en embriones. Aquí nos centraremos en el papel de los FGFRs durante el desarrollo embrionario.

Se ha mostrado cómo los FGFRs desempeñan un papel importante en el desarrollo de células derivadas de la capa celular embrionaria intermedia de los embriones tempranos, conocida como *mesodermo*. El mesodermo da lugar a muchos tipos celulares, incluyendo músculo, cartílago, hueso y células sanguíneas así como al precursor de la columna vertebral. Cuando algunos FGFRs específicos no funcionan correctamente, se afecta el desarrollo de tejidos mesodérmicos en particular. En un tipo de defecto de los FGFRs, una mutación del receptor produce efectos dominantes sobre el embrión en desarrollo. En otras palabras, incluso aunque el embrión produzca una cantidad sustancial de receptor normal funcional, la presencia de receptor mutado dentro de las células embrionarias evita el funcionamiento correcto de los receptores normales. La función normal se inhibe ya que los FGFRs deben funcionar juntos como dímeros para unir a los FGFs. Si un receptor normal dimeriza con un receptor mutado, entonces los procesos de fosforilación que ocurren normalmente dentro de la porción kinasa del receptor fallan, lo que bloquea la transmisión de señal (Figura 14.19). Una mutación como ésta, que evita la función del receptor normal, a veces es llamada **mutación dominante negativa**.

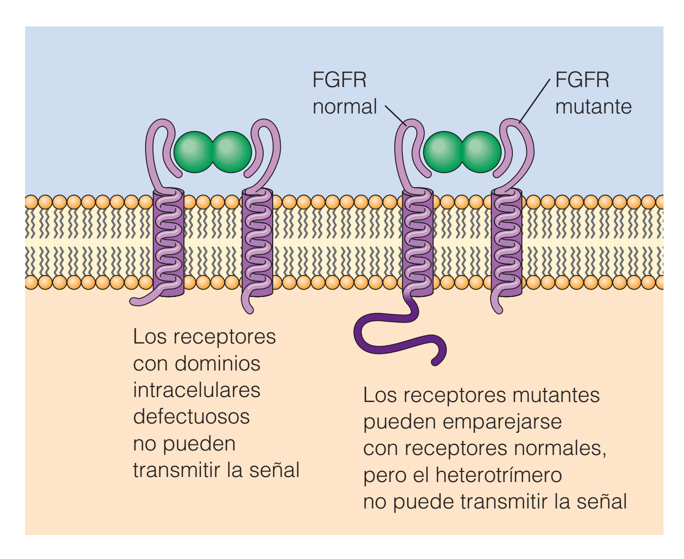
Las mutaciones dominantes negativas pueden tener efectos dramáticos en las células de los embriones en desarrollo. Por ejemplo, cuando se expresan FGFRs dominantes negativos generados por ingeniería genética en huevos de rana, y los huevos se fertilizan, los embriones no desarrollan tejidos mesodérmicos en el tronco y la cola, lo que produce «renacuajos» con cabeza pero sin cuerpo (Figura 14.20). En humanos, las mutaciones dominantes en la porción transmembrana del gen de *FGFR-3* produce la forma más común de enanismo, conocida como acondroplasia. Los individuos heterocigotos tienen un crecimiento óseo anormal en el que los huesos largos tienen una osificación (proceso por el que el cartílago se convierte en hueso durante la infancia) anormal. Una condición semejante conocida como *Displasia tanatofórica* se produce a menudo con una alteración en un único aminoácido en la porción citosólica de la proteína FGFR-3. En este caso, se producen anormalidades óseas más severas y los individuos afectados mueren poco tiempo después del nacimiento. Los efectos dramáticos de un cambio en un único aminoácido de una única proteína demuestran el papel fundamental que los receptores de los factores de crecimiento tienen durante el desarrollo humano.

Otros factores de crecimiento transducen sus señales a través de receptores serina/treonina kinasa

Hemos visto que cuando un receptor tirosina kinasa une un ligando, activa un conjunto de procesos de transducción intracelulares que producen cambios en la célula que recibe



(a) FGFR normal: FGF se une; FGFR forma un dímero



(b) Mutación dominante negativa de FGFR

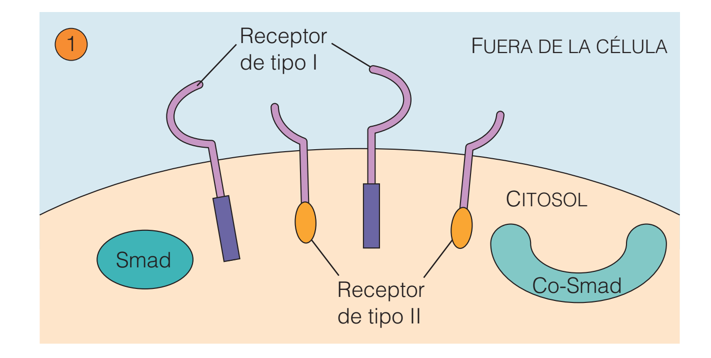
Figura 14.19 Inactivación dominante negativa de la función del receptor de FGF (FGFR). (**a**) Los receptores normales forman dímeros después de su unión a FGF y transmiten la señal apropiada a través de Ras y MAPK. (**b**) Cuando una célula produce receptores de EGF mutantes, los receptores normales pueden formar dímeros igual que en (**a**), o los receptores defectuosos se pueden unir a FGF y dimerizar con receptores normales. En este caso, no se transmite señal. Cuando están presentes cantidades suficientes de receptores mutantes, la mayoría de los receptores normales están emparejados con receptores mutantes, lo que produce una interrupción general de la señalización.

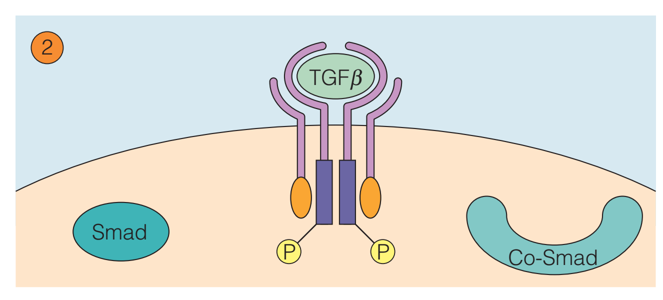


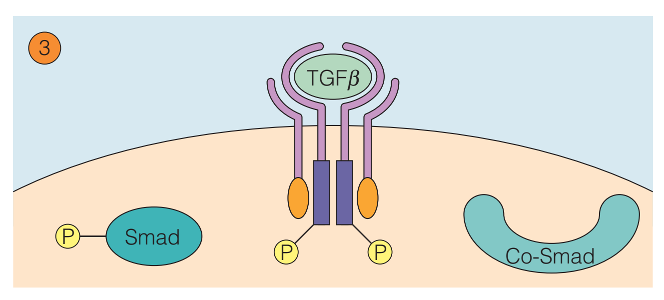
Figura 14.20 La señalización del factor de crecimiento fibroblástico es esencial para la producción del mesodermo en embriones. Izquierda: embrión normal de rana. Derecha: embrión derivado de un huevo inyectado con mRNA que codifica para una forma mutante dominante negativa del receptor de factor de crecimiento fibroblástico (FGF). Como resultado, el mesodermo no se desarrolla correctamente y el embrión carece de tronco y de cola.

la señal. Otra clase principal de receptores asociados a proteínas kinasa, emplean un conjunto muy diferente de vías de transducción de señal para desencadenar cambios dentro de la célula. Estos receptores fosforilan residuos de serina y treonina en lugar de tirosinas. Una clase principal de receptores serina/treonina kinasa incluye una familia de proteínas que se une a miembros de la familia de factores que de crecimiento del **factor de crecimiento transformante β (TGFβ)**. Esta familia de factores de crecimiento regula una amplia variedad de funciones celulares tanto en embriones como en animales adultos, incluyendo proliferación celular, muerte celular programada, especialización celular y algunos procesos clave en el desarrollo embrionario. Algunos de los miembros de la familia de TGFβ forman dímeros antes de unirse a los receptores apropiados.

El primer paso en la señalización a través de TGFβ es la unión del factor de crecimiento al receptor transmembrana (Figura 14.21). En general, los miembros de la familia de TGFβ se unen a dos tipos de receptores dentro de la célula receptora: los *receptores de tipo I y de tipo II.* Cuando el ligando está unido, los receptores de tipo II fosforilan al receptor de tipo I. El receptor de tipo I inicia entonces una cascada de transducción de señal dentro de la célula, fosforilando a una clase de proteínas conocidas como **Smads** (término acuñado a partir de los dos miembros que fundaron estas proteínas). En respuesta, la señal apropiada de la proteína Smad, activada por el receptor fosforilado, forma un complejo con una Smad adicional (una co-Smad), y las dos Smads se desplazan al núcleo. Una vez dentro del núcleo el complejo Smad se puede asociar con







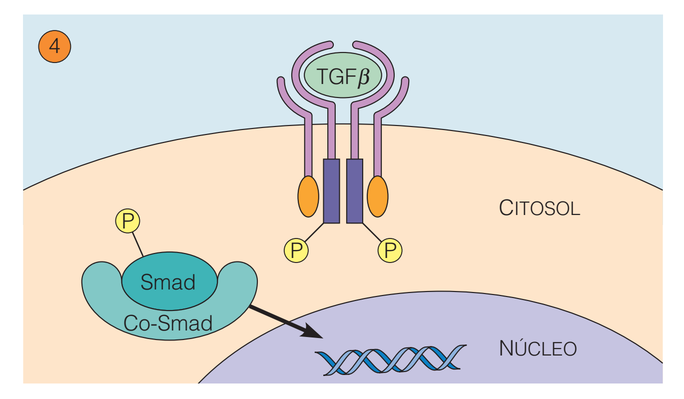


Figura 14.21 Transducción de señal por la familia de receptores TGFb. ① Los receptores de tipo I y de tipo II para TGFb en una célula antes de su unión al factor de crecimiento. ② La unión del factor de crecimiento produce la agrupación de receptores de tipo I y de tipo II, y la fosforilación de los receptores de tipo I por los receptores de tipo II. ③ Los receptores tipo I activados entonces fosforilan Smads particulares mediadas por receptor. ④ Estas Smads entonces se unen a otras Smads (coSmads) y juntas entran en el núcleo.

proteínas de unión al DNA para regular la expresión génica. Numerosas mutaciones en las proteínas Smad de células humanas parecen producir formas específicas de cáncer.

Las vías de los receptores de factores de crecimiento comparten algunos aspectos

Hemos visto que la fosforilación de un receptor transmembrana, seguida por una reacción compleja de procesos en cadena, es un aspecto común en la señalización celular que implica los factores de crecimiento y que a menudo conduce a cambios en proteínas que pueden alterar la expresión de genes de la célula diana. Sin embargo, no todos los receptores de factores de crecimiento, cuya función se basa en estos procesos de fosforilación, tienen su propia actividad kinasa. Por ejemplo, en el Capítulo 24 aprenderemos cómo la unión de algunos factores de crecimiento a sus receptores produce que el receptor active a una proteína kinasa intracelular separada, llamada la *kinasa activada por Janus.*

Aunque los detalles son diferentes en cada caso, hay algunos aspectos comunes implicados en los procesos de señalización de todos los factores de crecimiento. En primer lugar, la unión del ligando a menudo produce la activación y/o el agrupamiento de receptores. La activación de receptores conduce entonces a una cascada de procesos en la que diversas proteínas intermediarias a menudo pierden o ganan grupos fosfato. Finalmente, esta cascada conduce a cambios en una o más proteínas que entran en el núcleo para alterar la expresión de genes dentro de la célula que recibe la señal. La respuesta específica de la célula que recibe estas señales depende de la historia previa de la célula y de la combinación de señales a las que la célula está expuesta en un momento determinado. En la siguiente sección, veremos cómo en la señalización a largo plazo mediada por hormonas opera la misma lógica.

La interrupción de la señalización por factores de crecimiento puede conducir al cáncer

Hemos visto que los factores de crecimiento regulan procesos como la proliferación y el crecimiento celular y la expresión génica. Hemos visto también que el desarrollo embrionario requiere factores de crecimiento para regular estrechamente los procesos biológicos. Si el desarrollo embrionario es un ejemplo principal de los procesos que están regulados correctamente por los factores de crecimiento, muchos tipos de cáncer son exactamente un ejemplo de lo contrario. Sabemos en la actualidad que diversos tipos de cáncer se producen como consecuencia de la pérdida de la regulación de la señalización por factores de crecimiento. Por ejemplo, uno de los primeros genes identificados que causan cáncer es una forma mutante de Ras. Las mutaciones de Ras están asociadas a menudo con cáncer como veremos con más detalle en el Capítulo 24. En el caso de los receptores tirosina kinasa, por ejemplo, las mutaciones en el receptor del factor de crecimiento epidérmico pueden producir cáncer de mama, glioblastoma (cáncer de células gliales del cerebro) y fibrosarcoma (un tipo de cáncer de los huesos largos). Se han hecho descubrimientos similares

para los receptores serina/treonina kinasa. Se producen mutaciones en el receptor de tipo I de TGFβ en una tercera parte de los cánceres de ovario, y en muchos tipos de cáncer colorectal se producen mutaciones en el receptor de tipo II. En la mitad de todos los cánceres de páncreas se producen mutaciones en una de las Smads (Smad4). De esta forma, a medida que los biólogos celulares y del desarrollo han dilucidado éstas y otras vías de señalización, los biólogos del cáncer han descubierto que hay lazos de unión fundamentales entre la forma en que se originan el cáncer y la biología básica de la transducción de señal.

Sistema hormonal endocrino y paracrino

Tanto los animales como las plantas usan señales químicas llamadas **hormonas** para regular la función de diversas células y tejidos. Las hormonas son mensajeros químicos secretados por un tejido, que regulan la función de otras células o tejidos en el mismo organismo. A diferencia de los factores de crecimiento, las hormonas a menudo actúan a través de largas distancias. En plantas y animales, las hormonas frecuentemente se transportan a través del torrente circulatorio. Cientos de hormonas diferentes regulan una amplia variedad de funciones, muchas de ellas esenciales para mantenimiento de un estado fisiológico estacionario del organismo.

Aunque podemos considerarlas como un grupo en base a sus funciones reguladoras, las hormonas se diferencian en muchos aspectos. Algunas hormonas son esteroideas u otro tipo de moléculas hidrofóbicas que se unen a receptores intracelulares. Otras hormonas, como las hormonas adrenérgicas, que discutiremos más tarde en esta sección, se unen a una amplia variedad de receptores acoplados a proteínas G. Otras hormonas, como la insulina, son ligandos de receptores tirosina kinasa.

Tanto las plantas como los animales producen un conjunto amplio de hormonas. Por ejemplo, las plantas producen hormonas esteroideas llamadas *brasinosteroides* que regulan el crecimiento de la hoja. Igualmente, la molécula orgánica *etileno* regula la maduración del fruto y el *ácido abscícico* produce el cierre de los estomas durante condiciones de sequía. Sin embargo, debido a que las hormonas animales se comprenden mucho mejor, nos centraremos en ellas en el resto de nuestra exposición.

Las señales hormonales se pueden clasificar por la distancia a la que viajan hasta sus células diana

Todas las hormonas animales se pueden clasificar en una o dos categorías dependiendo de la distancia a la que operan. Una *hormona endocrina* viaja a través del sistema circulatorio desde las células que la liberan hasta otras células en las que regula una o más funciones específicas. Una *hormona paracrina* es una señal más local que es captada, destruida, o inmovilizada tan rápidamente que únicamente puede actuar en las células de su entorno inmediato.

Las hormonas endocrinas son sintetizadas por los *tejidos endocrinos* del cuerpo y son secretadas directamente al torrente circulatorio. Una vez que se secretan en el sistema circulatorio, las hormonas endocrinas tienen una vida media limitada, que oscila desde unos pocos segundos en el caso de la adrenalina (un producto de la glándula adrenal) a muchas horas como la insulina. A medida que circulan en el torrente circulatorio, las moléculas de hormona entran en contacto con receptores en tejidos a lo largo de todo el cuerpo. Un **tejido diana** es aquel que se ve afectado especialmente por una hormona en particular (Figura 14.22). Por ejemplo, el corazón y el hígado son tejidos diana para la adrenalina, mientras que el hígado y el músculo esquelético son dianas para la insulina.

Las hormonas controlan muchas funciones fisiológicas

Las hormonas regulan un amplio rango de funciones fisiológicas, que incluyen el crecimiento y desarrollo corporal, ritmos de procesos corporales, concentraciones de sustancias y respuestas al estrés o a las lesiones (Tabla 14.3).

Por ejemplo, la *somatotropina* en humanos está implicada en la regulación del crecimiento corporal en general, mientras que los *andrógenos* y *estrógenos*, hormonas sexuales, controlan la diferenciación de los tejidos y la consecución de los caracteres sexuales secundarios. La *tiroxina* regula el ritmo al que el cuerpo produce energía y por lo tanto son un ejemplo de una hormona controladora de un ritmo. Las hormonas que controlan la concentración de sustancias incluyen a la *insulina* (que controla los niveles sanguíneos de glucosa), la *aldosterona* (controla los niveles sanguíneos de sodio y potasio) y la *hormona paratiroidea* (que controla los niveles sanguíneos de calcio). La respuesta corporal al estrés está regulada por la *adrenalina*, *noradrenalina* y el *cortisol*, y la respuesta a lesiones locales está regulada por la liberación de *histamina* y la producción de *prostaglandinas*.

Las hormonas animales se pueden clasificar por sus propiedades químicas

Las hormonas se pueden clasificar no sólo de acuerdo a su función y a la distancia a la que actúan, sino también de acuerdo a sus propiedades químicas (Tabla 14.4). Las hormonas endocrinas se clasifican químicamente en cuatro categorías: derivados de aminoácidos, péptidos, proteínas y hormonas lipídicas como los esteroides. Un ejemplo de un derivado de aminoácido es la adrenalina, derivado de la tirosina. La *hormona antidiurética* (llamada también *vasopresina*) es un ejemplo de hormona peptídica, mientras que la insulina es una proteína. Las hormonas esteroideas son derivados del colesterol (*véase* Figura 3.30) y son sintetizadas o bien en las gónadas (*hormonas sexuales*) o en la cor-

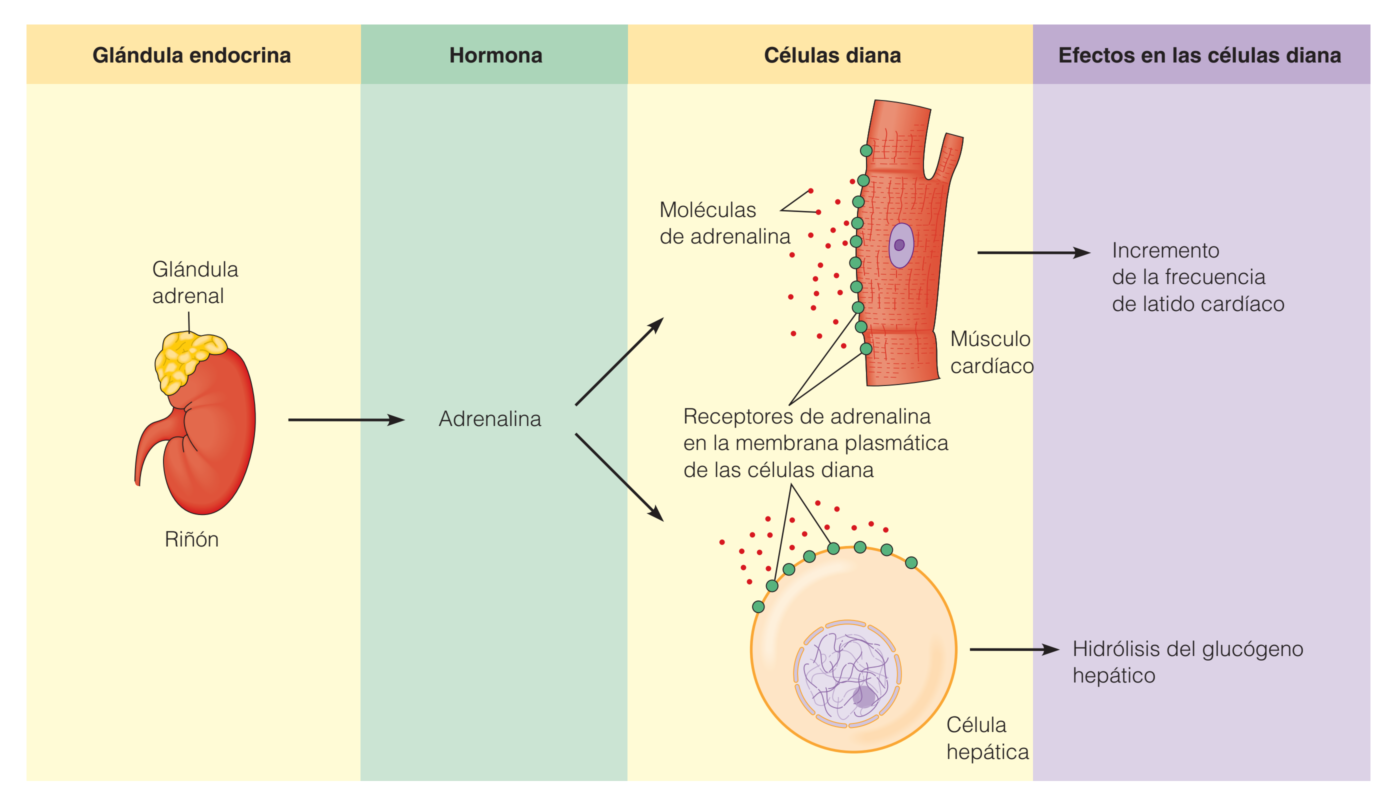


Figura 14.22 **Tejidos diana para las hormonas endocrinas.** Las células de un tejido diana tienen en su membrana plasmática receptores específicos para hormonas (en el caso de las hormonas esteroideas, los receptores están presentes en el núcleo o en el citosol). Las células cardíacas y hepáticas pueden responder a la adrenalina sintetizada por las glándulas adrenales ya que estas células tienen receptores específicos de adrenalina en sus superficies externas. Una hormona específica puede inducir distintas respuestas en distintas células diana. La adrenalina produce un incremento en el ritmo de contracción cardíaca y estimula la hidrólisis de glucógeno en el hígado.

Tabla 14.3 **Funciones fisiológicas de las hormonas**

Función bajo control hormonal	Hormona	Origen (tejido endocrino)
Crecimiento y desarrollo		
Tamaño corporal	Somatotropina (hormona de crecimiento)	Hipófisis anterior
Desarrollo sexual	Andrógenos (machos)	Testículos
	Estrógenos (hembras)	Ovarios
Ciclo reproductivo	Hormona luteinizante	Hipófisis anterior
	Hormona estimulante de los folículos	Hipófisis anterior
	Gonadotropina coriónica	Folículos
Ritmos de procesos corporales		
Secreción hormonal	Hormonas trópicas	Hipófisis anterior
Metabolismo basal	Tiroxina	Tiroides
Captación de glucosa	Insulina	Páncreas
Filtración renal	Hormona antidiurética (vasopresina)	Hipófisis posterior
Contracción uterina	Oxitocina	Hipófisis posterior
Concentración de sustancias		
Glucosa sanguínea	Glucagón, insulina	Páncreas
Balance de minerales	Corticosteroides	Corteza adrenal
Calcio sanguíneo	Hormona paratiroidea	Paratiroides
Respuestas al estrés y a la lesión		
Ritmo cardíaco	Adrenalina	Médula adrenal
Presión sanguínea	Adrenalina	Médula adrenal
Inflamación	Histamina	Mastocitos
	Prostaglandinas	Todos los tejidos
	Corticosteroides (cortisol)	Corteza adrenal

Tabla 14.4 Clasificación química y funciones de las hormonas

Clasificación química	Ejemplos	Función regulada
Hormonas endocrinas		
Derivados de aminoácidos	Adrenalina (epinefrina) y noradrenalina (ambos derivados de la tirosina)	Respuestas al estrés: regulación de la frecuencia de latido cardíaca y de la presión sanguínea; liberación de glucosa y ácidos grasos desde sitios de almacenamiento
	Tiroxina (derivado de la tirosina)	Regulación del ritmo metabólico
Péptidos	Hormona antidiurética (vasopresina)	Regulación del agua corporal y de la presión sanguínea
	Hormonas hipotalámicas (factores de liberación)	Regulación de la liberación de hormonas de la hipófisis anterior
Proteínas	Hormonas de la hipófisis anterior	Regulación de otros sistemas endocrinos
Esteroides	Hormonas sexuales (andrógenos y estrógenos)	Desarrollo y control de la capacidad reproductora
	Corticosteroides	Respuestas al estrés; control de los electrolitos sanguíneos
Hormonas paracrinas		
Derivados de aminoácidos	Histamina	Respuestas locales al estrés y a lesiones
Derivados del ácido araquidónico	Prostaglandinas	Respuestas locales al estrés y a lesiones

teza adrenal (*corticosteroides*). En el Capítulo 23 discutiremos el mecanismo de acción de las hormonas esteroideas; en este capítulo nos entraremos en las hormonas solubles en agua (no lipídicas).

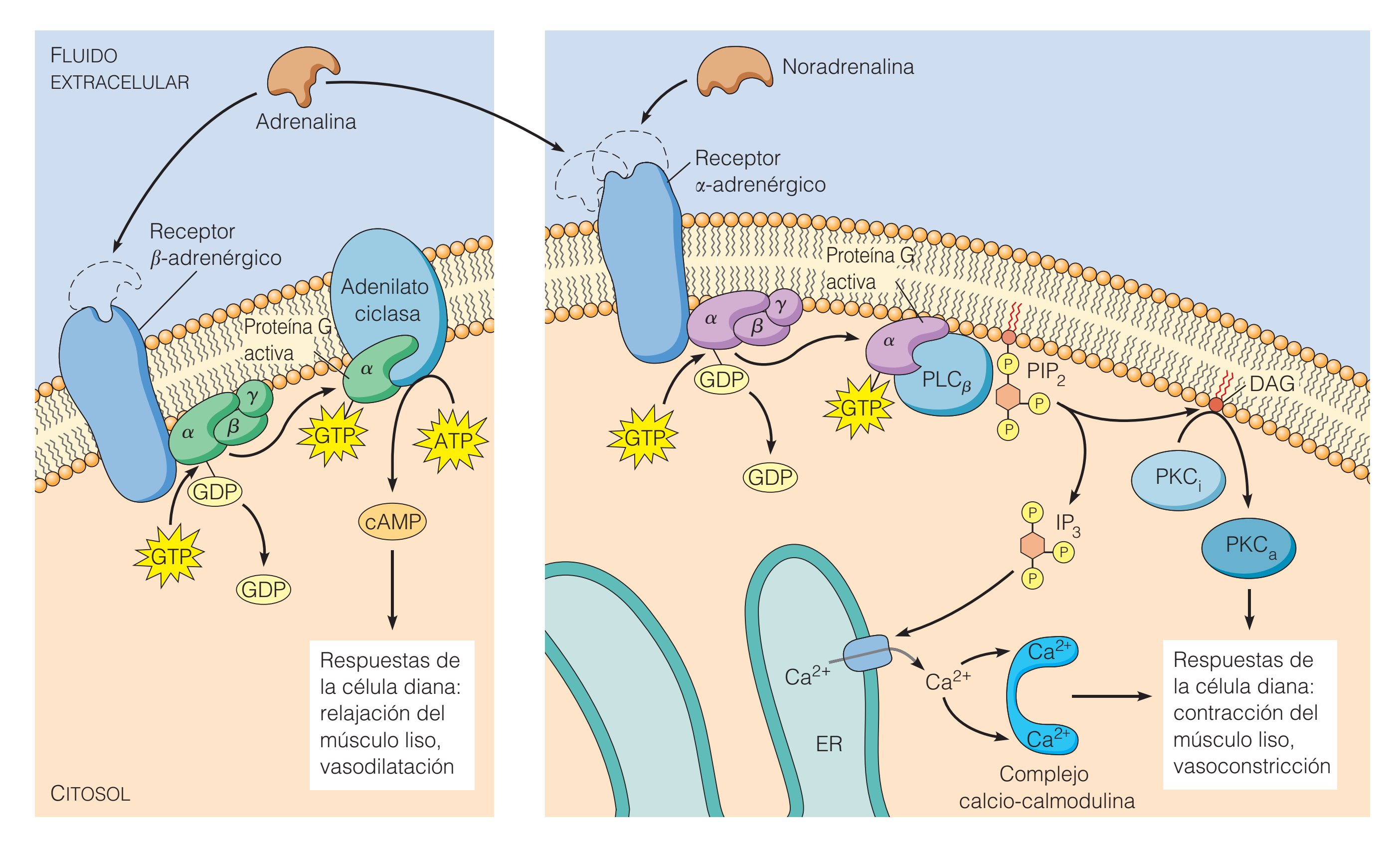
La histamina y las prostaglandinas son ejemplos de hormonas paracrinas. La *histamina* se produce por la descarboxilación del aminoácido histidina y es responsable de las respuestas inflamatorias locales. Las *prostaglandinas*, llamadas así porque fueron identificadas inicialmente en el semen humano como secreción de la glándula prostática, son derivados del ácido araquidónico y son importantes en la función del músculo liso.

Las hormonas y los receptores adrenérgicos son un buen ejemplo de regulación endocrina

Debido a que las hormonas modulan la función de tejidos diana particulares, un aspecto importante del estudio de las hormonas es la comprensión de las funciones específicas de sus tejidos diana. Para ilustrar cómo actúan las hormonas endocrinas, examinaremos con más detalle las **hormonas adrenérgicas** adrenalina y noradrenalina (la adrenalina se llama también epinefrina; las dos palabras proceden del latín y del griego, respectivamente, y significan «por encima o cerca del riñón cerrar», haciendo referencia a la localización corporal de las *glándulas adrenales*, que sintetizan esta hormona). Cuando se secretan adrenalina y noradrenalina a la circulación sanguínea estimulan cambios en muchos tejidos u órganos, todos ellos dirigidos a preparar al organismo frente a situaciones peligrosas o estresantes (la llamada «respuesta a la lucha»). En general, las hormonas adrenérgicas producen un incremento en la respuesta cardíaca, desviando la sangre de los órganos viscerales hacia los músculos y al corazón, así como dilatando las arteriolas para facilitar la oxigenación de la sangre. Además, estas hormonas estimulan la hidrólisis de glucógeno para aportar glucosa a los músculos.

Las hormonas adrenérgicas se unen a una familia receptores acoplados a proteínas G conocidos como **receptores adrenérgicos**. Los miembros individuales de esta familia se diferencian principalmente en su preferencia por la adrenalina o la noradrenalina, y por la proteína G a la que está unida al receptor. Se pueden clasificar de manera general en receptores adrenérgicos α o β. Los receptores α-adrenérgicos se unen tanto a adrenalina como a noradrenalina. Esto receptores están localizados en la musculatura lisa y regulan el flujo sanguíneo de los órganos viscerales. Los receptores β-adrenérgicos unen adrenalina mucho mejor que noradrenalina. Estos receptores se encuentran en la musculatura lisa asociada a arteriolas que alimentan al corazón, músculos lisos de los bronquiolos en los pulmones y el músculo esquelético.

Los receptores α y β-adrenérgicos estimulan vías de transducción de señal diferentes, debido a que están unidos a proteínas G diferentes (Figura 14.23). Por ejemplo, las proteínas G_p, son las proteínas G activadas el receptor α_1-adrenérgico, un tipo de receptor α-adrenérgico, mientras que los receptores β-adrenérgicos activan a G_s. Como discutimos anteriormente, la activación de G_s estimula la vía de transducción de señal del cAMP, lo que produce la relajación de algunos músculos lisos. La activación de G_p estimula a la fosfolipasa C, lo que conduce a la producción de IP_3 y DAG, que a su vez eleva los niveles intracelulares de calcio. La Tabla 14.5 resume algunas de las principales fun-



(a) Vía del cAMP iniciada por la activación de receptores β-adrenérgicos

(b) Vía de inositol-fosfolípidos-calcio iniciada por la activación del receptor α-adrenérgicos

Figura 14.23 Estimulación de vías de transducción de señal acopladas a proteínas G por los receptores α- y β-adrenérgicos. Los receptores α- y β-adrenérgicos son una familia cercana de receptores acoplados a proteínas G. Cada receptor se une a la adrenalina o a noradrenalina. Aunque los dos tipos de receptores se pueden unir a la misma hormona (adrenalina, por ejemplo), activan distintas vías de transducción de señal ya que activan a distintas proteínas G. (**a**) Los receptores β activan a Gs y estimulan la vía de transducción de señal de cAMP. (**b**) Los receptores α activan a Gp y estimulan la vía de transducción de señal de inositol-fosfolípidos-calcio.

Tabla 14.5 Ejemplos de funciones celulares reguladas por cAMP

Función regulada	Tejido diana	Hormona
Degradación de glucógeno	Músculo, hígado	Adrenalina
Producción de ácidos grasos	Adiposo	Adrenalina
Ritmo cardíaco, presión sanguínea	Cardiovascular	Adrenalina
Reabsorción de agua	Riñón	Hormona antidiurética
Resorción del hueso	Hueso	Hormona paratiroidea

ciones fisiológicas reguladas por cAMP. Como ejemplo específico de regulación mediada por cAMP, consideraremos el control de la degradación del glucógeno por la hormona adrenalina en el hígado o en las células musculares.

Efectos intracelulares de la vía del cAMP: control de la degradación del glucógeno. Una de las acciones de las hormonas adrenérgicas es la estimulación de la hidrólisis del glucógeno para proporcionar a las células musculares un aporte adecuado de glucosa. La ruptura del glucógeno está catalizada por la enzima *glucógeno fosforilasa*, que elimina unidades de glucosa del glucógeno en forma de glucosa-1-fosfato mediante la adición de fósforo inorgánico (P_i). El sistema de la glucógeno fosforilasa constutiye la primera secuencia reguladora mediada por cAMP que se elucidó. El trabajo original fue publicado en 1956 por Earl Sutherland, quien recibió el Premio Nobel en 1971 por su descubrimiento.

En la Figura 14.24 se muestra la secuencia de procesos que conduce al incremento de la degradación del glucógeno desde la estimulación hormonal. Ésta comienza con la unión de una molécula de adrenalina a su receptor β-adrenérgico en la membrana plasmática de una célula hepática

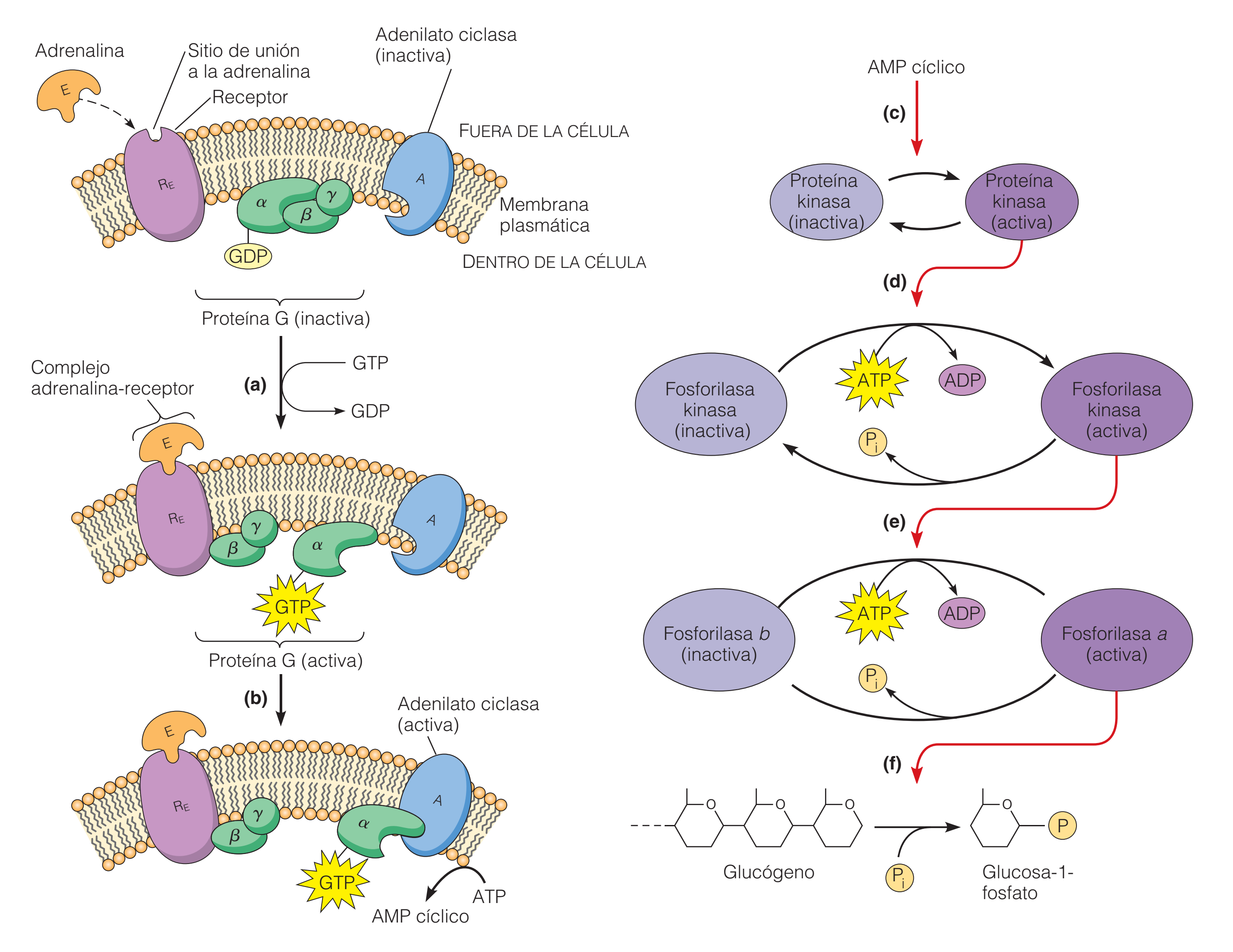


Figura 14.24 **Estimulación de la hidrólisis de glucógeno por adrenalina.** Las células del músculo y del hígado responden a concentraciones elevadas de adrenalina en la sangre incrementando su ritmo de hidrólisis de glucógeno. En efecto estimulador de la adrenalina extracelular sobre el catabolismo intracelular del glucógeno está mediado por una cascada reguladora de proteínas G-cAMP cíclico. En este caso, el ligando es adrenalina (E) y la proteína de membrana a la que se une es un receptor β-adrenérgico (R_E). **(a)** La unión de adrenalina a su receptor activa a la proteína Gs, lo que produce la disociación del complejo GTP-Gα. **(b)** El complejo GTP-Gα entonces se une a la adenilato ciclasa (A) activándola. **(c)** A medida que se incrementa la concentración intracelular de cAMP cíclico, cAMP inicia una cascada adicional de eventos reguladores que comienza con la activación de la proteína kinasa A. **(d)** La proteína kinasa A activada convierte entonces a la fosforilasa kinasa inactiva a su forma activa, por una fosforilación dependiente de ATP. **(e)** La fosforilasa kinasa activa, a su vez, fosforila a la fosforilasa *b*, convirtiéndola en fosforilasa *a*, la forma activa de esta enzima. **(f)** La fosforilasa *a* entonces cataliza la hidrólisis fosforolítica del glucógeno en moléculas de glucosa-1-fosfato.

o muscular. Como describimos anteriormente, el receptor activa una proteína G_s vecina, y la proteína G_s estimula la adenilato ciclasa, enzima unida a la membrana que genera cAMP a partir de ATP (Figura 14.24a). El incremento transitorio resultante en la concentración de cAMP en el citosol activa a la proteína kinasa A. PKA activa entonces otra cascada de eventos que comienza con la fosforilación de la enzima *fosforilasa kinasa*. Esto conduce a la conversión de la *glucógeno fosforilasa* de la *fosforilasa b*, menos activa, a la *fosforilasa a*, forma más activa, y así, a un incremento en la tasa de hidrólisis del glucógeno (Figura 14.24b).

El cAMP también estimula la inactivación de un sistema enzimático responsable de la síntesis de glucógeno. En este caso, cAMP activa a PKA como hemos visto, que a continuación fosforila a la enzima *glucógeno sintasa*. La fosforilación inactiva a esta enzima en vez de activarla. De esta forma, el efecto general que cAMP implica tanto un incremento en la hidrólisis de glucógeno como una disminución de su síntesis. Los ejemplos de la glucógeno fosforilasa y de la glucógeno sintasa demuestran también como la fosforilación puede tener efectos muy diferentes sobre la actividad enzimática, dependiendo de qué enzima se considere.

Receptores α-adrenérgicos y la vía de inositol-fosfolípidos-calcio. Otra vía adrenérgica importante está representada por los receptores α_1-adrenérgicos, que estimulan la producción de inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). Los receptores α_1-adrenérgicos se encuentran principalmente en músculos lisos de los vasos sanguíneos, incluyendo los que controlan el flujo sanguíneo del intestino. Cuando se estimulan los receptores α_1-adrenérgicos, la formación de IP_3 induce un incremento en la concentración intracelular de calcio. Los niveles elevados de calcio producen la contracción del músculo liso, lo que resulta la contracción de los vasos sanguíneos con lo que el flujo sanguíneo disminuye. Así, la activación de los receptores α_1-adrenérgicos afecta a las células musculares lisas de manera opuesta a la activación β-adrenérgica, que produce la relajación de los músculos lisos.

Coordinación de las respuestas a las hormonas adrenérgicas. Podemos ahora considerar cómo la secreción de adrenalina y noradrenalina conduce a cambios coordinados en varios tejidos que son necesarios para preparar al cuerpo ante situaciones de estrés. La estrategia general de las acciones de la hormona adrenérgica es poner en alerta muchas de las funciones corporales normales, conducir reservas a la musculatura cardíaca y esquelética, así como producir un estado elevado de alerta. Esto se lleva a cabo por las hormonas adrenérgicas y el sistema de receptores α y β-adrenérgicos que producen esencialmente efectos opuestos en un tejido en particular como el músculo liso. Los receptores predominantes presentes en un determinado tejido condicionan la respuesta de ese tejido a las hormonas adrenérgicas.

Usando el músculo liso como ejemplo, podemos ver cómo la elevación del nivel de cAMP produce la relajación del músculo liso, y la elevación del nivel intracelular de calcio produce su contracción (cAMP y calcio coordinan muchos de los cambios de necesarios en el flujo sanguíneo). La estimulación de los receptores β-adrenérgicos en los músculos lisos que rodean a los vasos sanguíneos del corazón y de los bronquiolos pulmonares (vías estrechas para el flujo de aire), produce relajación muscular. Como resultado, el flujo sanguíneo del corazón se incrementa y se ensanchan las vías aéreas, facilitando una mejor oxigenación de la sangre. Al mismo tiempo, la estimulación de los receptores α_1-adrenérgicos de los músculos lisos que rodean las venas periféricas produce su contracción, lo que constriñe las venas más pequeñas. Esto genera un flujo sanguíneo disminuido a la piel, riñones y tracto digestivo, un incremento de la presión sanguínea y el desvío de la sangre de aquellos tejidos donde es más necesaria: corazón, pulmones y músculo esquelético. Éstos son sólo algunos efectos de la estimulación adrenérgica, pero dan una idea del esfuerzo coordinado necesario para preparar al cuerpo frente al estrés o a la actividad intensa.

Las prostaglandinas son un buen ejemplo de regulación paracrina

Recuerde que las hormonas paracrinas son sustancias secretadas por células que afectan a otras células situadas a una distancia corta. En este caso, el mensajero tiene claramente un rango limitado de acción. Un ejemplo de un mensajero clasificado comúnmente como una hormona paracrina son las prostaglandinas. Las prostaglandinas actúan generalmente sobre receptores acoplados a proteínas G para estimular o bien la vía de mensajeros secundarios del cAMP o la del inositol-trifosfato-calcio. Las prostaglandinas tienen diversos efectos, muchos de los cuales implican al músculo liso.

Por ejemplo, las prostaglandinas presentes en el semen estimulan la contracción de la musculatura lisa uterina, lo que ayuda a transportar los espermatozoides hacia el óvulo. Las prostaglandinas también ayudan a iniciar la contracción del músculo liso durante el parto y se pueden usar para inducir clínicamente el parto. Algunas prostaglandinas producen la relajación del músculo liso y pueden, por ejemplo, causar dilatación de los bronquiolos o disminución de la presión sanguínea. Las prostaglandinas son también importantes en la activación de las plaquetas sanguíneas, componentes especiales en el mecanismo de coagulación sanguínea que repara aquellos sitios donde los vasos sanguíneos están dañados.

Señalización celular y apoptosis

La transducción de señal no es únicamente importante en la regulación hormonal y la señalización de los factores de crecimiento. La señalización celular también regula un tipo programado de muerte celular o **apoptosis**. La apoptosis es un evento clave en muchos procesos biológicos. En los embriones, se produce apoptosis en diversas circunstancias. Algunos ejemplos incluyen la eliminación de las membranas entre los dígitos (dedos de las manos y de los pies) durante el desarrollo de manos y pies, la reabsorción de la cola de los renacuajos cuando éstos experimentan la metamorfosis, y la «poda» de neuronas que se produce en los humanos durante los primeros meses de vida mientras están madurando las conexiones dentro del cerebro en desarrollo. En humanos adultos, la apoptosis ocurre de manera continua. Cuando las células son infectadas por patógenos o cuando los leucocitos alcanzan el final de su ciclo vital, son eliminados a través de apoptosis. Como consecuencia, en el cuerpo humano mueren millones de células cada minuto. Cuando las células que deberían morir por apoptosis no lo hacen, las consecuencias pueden ser calamitosas. Ahora sabemos que las mutaciones en algunas proteínas que participan en la apoptosis pueden producir cáncer; frecuentemente el melanoma se produce a partir de una mutación en Apaf-1, una proteína que participa en la apoptosis.

La apoptosis es muy diferente de otro tipo de muerte celular conocido como *necrosis*, que en algunas ocasiones se produce después de la lesión tisular. Mientras que la necrosis implica que las células dañadas se hinchen y se rompan, la apoptosis implica una serie específica de procesos que conducen al desmantelamiento de los contenidos internos de la célula (Figura 14.25). Durante las primeras fases de la apoptosis, el DNA de las células es segregado cerca de la periferia del núcleo y el volumen del citoplasma disminuye. A continuación, la célula comienza a producir pequeñas evaginaciones citoplásmicas esféricas («blebs»), y el núcleo y los orgánulos comienzan a fragmentarse. El DNA de las células es seccionado a intervalos regulares por una endonucleasa de DNA específica de apoptosis, o *DNasa* (enzima que digiere al DNA). Como consecuencia, los fragmentos de DNA, que tienen longitudes que son múltiplos de 200 pares de bases, constituyen una «escalera» de fragmentos con utilidad diagnóstica. Finalmente la célula es desmantelada en pequeñas piezas llamadas *cuerpos apoptóticos*. Los restos de la célula afectada son finalmente eliminados por otras células vecinas (generalmente macrófagos) mediante fagocitosis (*véase* Capítulo 12). Los macrófagos actúan como carroñeros que eliminan los restos celulares resultantes.

El que las células tengan una «muerte programada» fue demostrado por primera vez de manera concluyente en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, en el que se identificaron por primera vez los genes clave que controlan la apoptosis (*véase* Anexo 14A). Las investigaciones posteriores han demostrado que muchos otros organismos, incluyendo a los mamíferos, usan proteínas similares durante la apoptosis. Como resultado de estos estudios, ahora se conocen muchos de los procesos moleculares que subyacen a la apoptosis. Un evento clave en la apoptosis es la activación de una serie de enzimas llamadas **caspasas**. (Las caspasas reciben su nombre debido a que contienen una cisteína en su sitio activo, e hidrolizan proteínas en sitios que contienen residuos de ácido aspártico seguidos de cuatro aminoácidos que son específicos para cada caspasa.) Las caspasas son producidas como precursores inactivos llamados **procaspasas** que son posteriormente hidrolizados para generar enzimas activas, frecuentemente por otras caspasas en una cascada proteolítica. Una vez que se activan, las caspasas fragmentan otras proteínas dentro de las células, lo que produce la muerte eficiente y precisa de la célula en la que se activan. La DNasa específica de apoptosis es un buen ejemplo; está unida a una proteína inhibidora que es fragmentada por una caspasa.

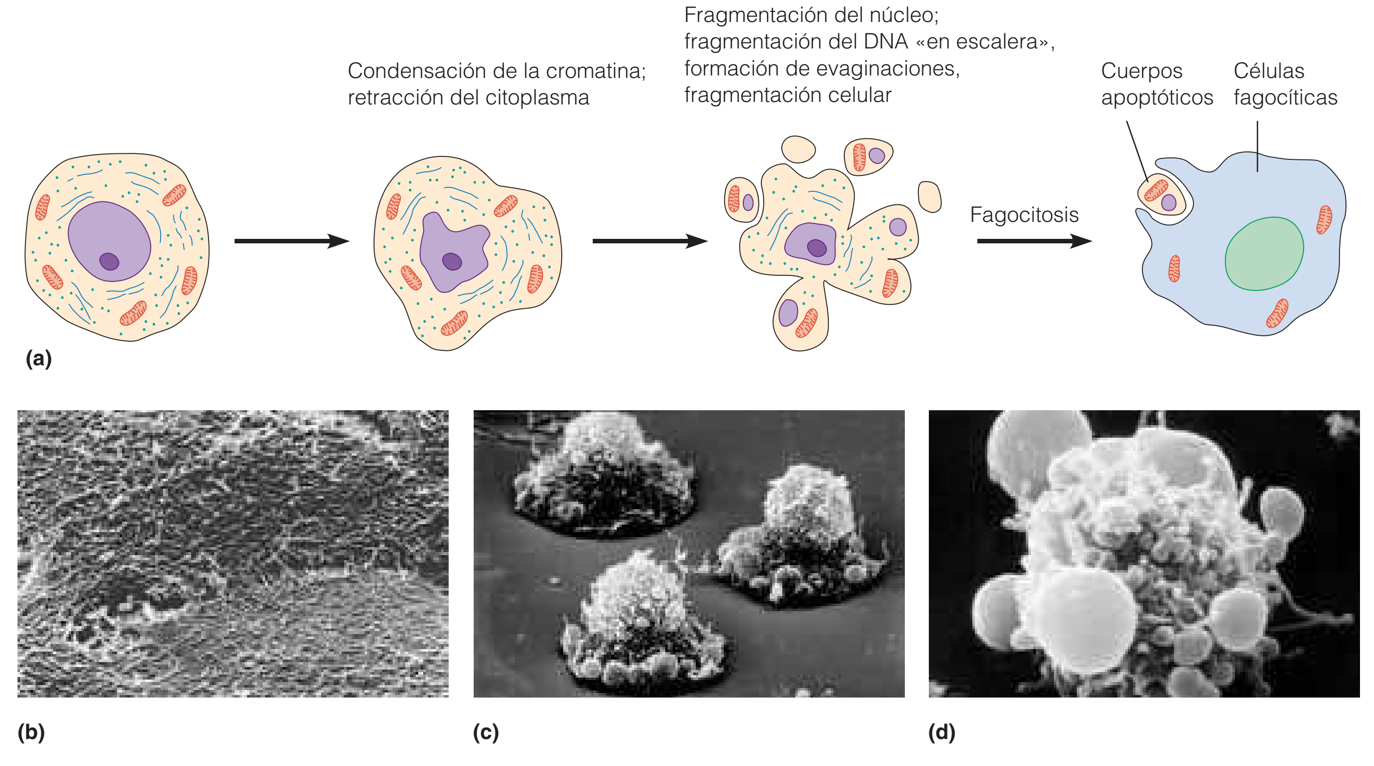


Figura 14.25 Pasos principales de la apoptosis. (**a**) Al mismo tiempo que una célula comienza a sufrir apoptosis, su cromatina se condensa y su citoplasma se retrae. Finalmente el núcleo se fragmenta, el DNA es digerido a intervalos regulares («en escalera»), el citoplasma se fragmenta y la célula emite numerosas evaginaciones esféricas (blebs). Finalmente, los restos de la célula muerta (cuerpos apoptóticos) son digeridos por células fagocíticas. (**b-d**) SEMs de células epiteliales sufriendo apoptosis. (**b**) Las células epiteliales en contacto con otras en cultivo forman láminas planas. (**c**) A medida que avanza la apoptosis, la célula se redondea retrae sus conexiones con las otras células y produce evaginaciones. (**d**) Una única célula muerta con muchos cuerpos apoptóticos.

La apoptosis está desencadenada por señales de muerte o por la retirada de factores de supervivencia

Existen dos rutas principales a través de las cuales las células pueden activar caspasas y entrar en la vía apoptótica (Figura 14.26). En algunos casos, la activación de las caspasas ocurre directamente. Por ejemplo, cuando las células del cuerpo humano son infectadas por algunos virus, se activa una población de linfocitos asesinos e inducen el inicio de la apoptosis de las células infectadas. ¿Cómo inducen los linfocitos que las células se suiciden mediante apoptosis? Esta activación se desencadenada generalmente cuando las células reciben *señales de muerte celular*. El *factor de necrosis tumoral* y *CD95/Fas* son dos señales letales bien conoci-

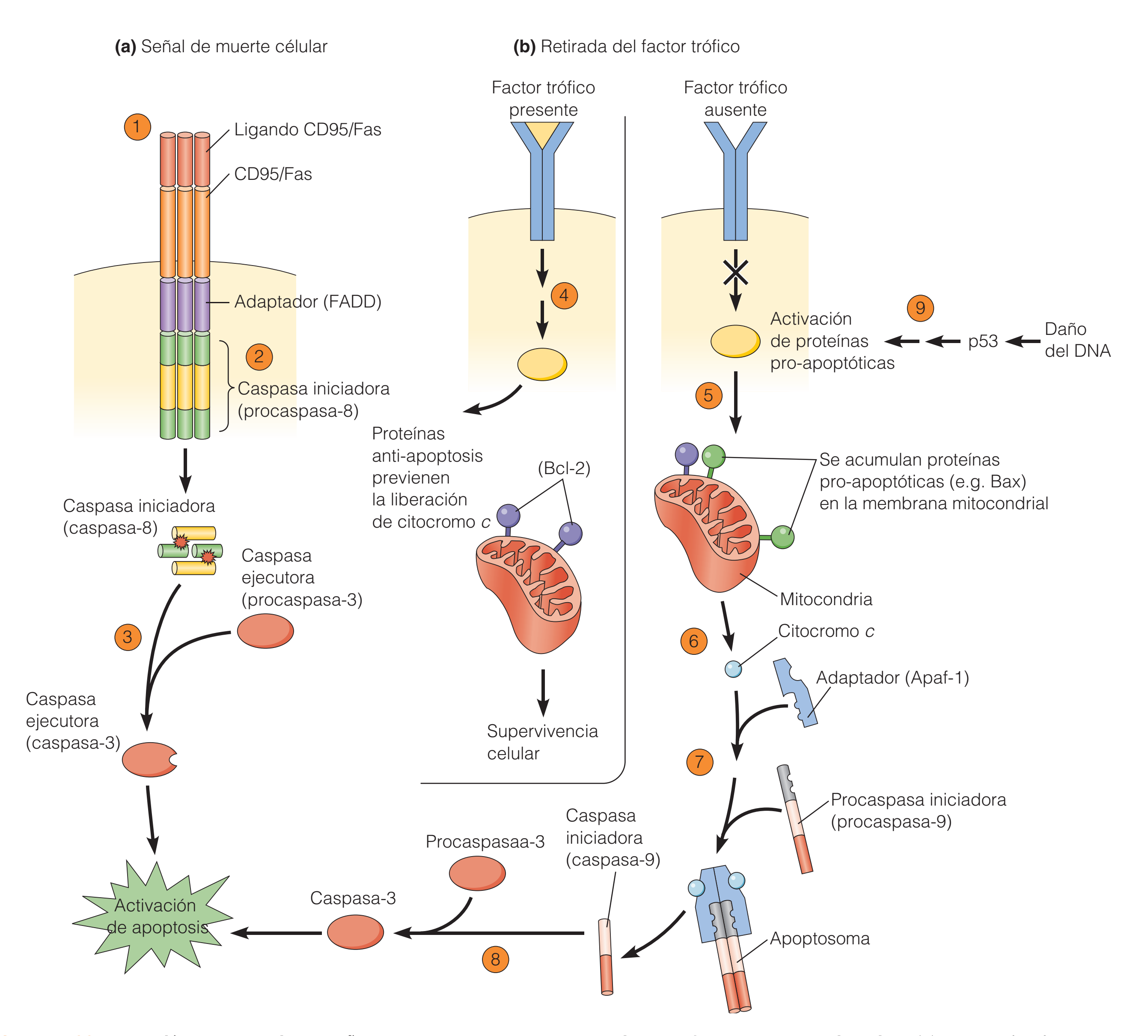


Figura 14.26 Inducción de apoptosis por señales de muerte celular o por la retirada de factores de supervivencia. (**a**) Las señales de muerte celular, como el ligando de CD95/Fas en la superficie de un linfocito asesino, pueden conducir a la apoptosis. ① El ligando de CD95/Fas se une a la proteína CD95/Fas en la superficie de las célula diana. La unión produce el agrupamiento de receptores y el reclutamiento de proteínas adaptadoras de la célula diana, lo que conduce al agrupamiento de la proteína procaspasa iniciadora (procaspasa-8). ② Entonces, el iniciador de las caspasas se activa. Después de que se active, ③ el iniciador de caspasas activa a la caspasa ejecutora, caspasa-3, un iniciador clave de la apoptosis. (**b**) ④ Cuando están presentes factores tróficos, la señalización celular produce la inactivación de las proteínas pro-apoptóticas, y la célula entra en apoptosis. ⑤ Cuando se retiran los factores tróficos, las proteínas pro-apoptóticas se activan, y algunas se acumulan en la membrana externa de la mitocondria. ⑥ El balance entre las proteínas por pro-apoptóticas y anti-apoptóticas (como Bcl-2) en la membrana mitocondrial externa determina si la mitocondrial libera o no citocromo *c*. ⑦ El citocromo *c* forma un complejo con otras proteínas, que conduce a la activación de una caspasa de iniciación (caspasa-9). ⑧ La caspasa iniciadora entonces activa a la caspasa ejecutora, caspasa-3, lo que conduce a la apoptosis. ⑨ El deterioro del DNA puede también conducir a la apoptosis a través de la actividad de la proteína p53.

das. Nos centraremos en CD95, una proteína de la superficie de las células infectadas. Los linfocitos tienen una proteína en su superficie que se une a CD95, produciendo su agregación dentro la célula infectada (Figura 14.26a). La agregación de CD95 produce la unión de proteínas adaptadoras a los complejos de CD95, lo que recluta a una procaspasa (*procaspasa-8*) a los lugares donde se produce la agrupación de receptores. Cuando se activa la procaspasa, actúa como iniciador de la cascada de caspasas. Un evento clave en esta *iniciación de las caspasas* es la activación de la *caspasa ejecutora*, conocida como **caspasa-3**. La caspasa-3 activa es importante para activación de muchos pasos en la apoptosis.

En otros casos, la apoptosis es iniciada indirectamente. Uno de los casos mejor estudiados de este segundo tipo de apoptosis implica a los factores de supervivencia. Los factores de supervivencia median en uno de las muchas funciones asociadas con los factores de crecimiento: la supervivencia celular. Cuando estos factores son retirados, la célula entra en apoptosis. La mitocondria es sorprendentemente un punto clave de acción de esta segunda vía. La conexión entre la mitocondrias y la muerte celular puede resultar sorprendente, pero además de su papel en la producción energía, las mitocondrias son claramente importantes en la apoptosis. Si la retirada de factores tóxicos es una sentencia de ejecución, entonces los verdugos son las mitocondrias.

¿Cómo aceleran la muerte celular las mitocondrias? En la célula saludable que no ha entrado en apoptosis, hay numerosas proteínas *anti-apoptóticas* en la membrana mitocondrial externa que evitan la apoptosis, pero únicamente mientras la célula está expuesta a factores de crecimiento. Estas proteínas están relacionadas estructuralmente con una proteína conocida como **Bcl-2**, la proteína anti-apoptótica mejor conocida. Bcl-2, y otras proteínas anti-apoptóticas, produce sus efectos contrarrestando a otras proteínas que son también similares estructuralmente a Bcl-2. Estas proteínas, sin embargo, *promueven* la apoptosis, por lo que se denominan colectivamente como proteínas *pro-apoptóticas*. Estas proteínas (como las proteínas llamadas *Bax* y *Bad*), se pueden insertar en la membrana externa mitocondrial, pero únicamente lo hacen de manera significativa cuando no están presentes los factores tróficos. Así, las proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas emprenden una batalla en muchas células; cuando el balance se inclina hacia las proteínas pro-apoptóticas, es más probable que la célula sufra apoptosis.

Sorprendentemente las mitocondrias desencadenan la apoptosis liberando **citocromo C** al citosol. Aunque, como podrá recordar, el citocromo C normalmente está implicado en el transporte de electrones (*véase* Capítulo 10), también tienen otras funciones importantes desencadenando la apoptosis al menos de dos formas. En primer lugar, el citocromo C estimula la liberación de calcio de las mitocondrias adyacentes y del retículo endoplásmico al unirse a los receptores de IP_3. En segundo lugar, puede activar un iniciador de procaspasas asociado a la mitocondrias, conocido como *procaspasa-9*. Esto lo hace reclutando una proteína adaptadora citosólica (conocida como Apaf-1) que se une a la procaspasa-9 en un complejo a veces denominado *apoptosoma*; el apoptosoma promueve la producción de caspasa-9 activa. Al igual que otros inhibidores de caspasas, la caspasa-9 activa a la caspasa ejecutora, caspasa-3. Así, al final los dos mecanismos de muerte celular conducen a la activación de una caspasa como que inicia la apoptosis.

Existe otra situación que puede desencadenar la vía mitocondrial de apoptosis. Cuando una célula sufre un daño que es incapaz de reparar, puede desencadenar su propia muerte. En particular, cuando el DNA de la célula es dañado (por ejemplo, mediante la variación de luz ultravioleta) puede entrar en apoptosis a través de la actividad de una proteína conocida como *P53* (P53 es un regulador importante de ciclo celular; en el Capítulo 19 aprenderá más acerca de P53). Al igual que la retirada de factores tróficos, la vía de P53 puede también activar proteínas pro-apoptóticas para desencadenar la apoptosis.

Perspectiva

La mayoría de las células responden a las hormonas, factores de crecimiento y otras sustancias presentes en el fluido extracelular. Estas respuestas están mediadas por proteínas receptoras de la superficie celular o de su interior. Cada proteína receptora tiene un sitio de unión específico para su ligando en particular. En el caso de los receptores de membrana, la unión del ligando va seguida de la transmisión de la señal al interior de la célula regulando por lo tanto procesos intracelulares específicos.

Se conocen numerosos mecanismos diferentes para transducción de señales. Una vía importante de transducción de señal implica a los receptores acoplados a proteínas G. Las proteínas G se activan cuando la unión de un ligando a un receptor vecino produce un cambio conformacional en la proteína G, que tiene como consecuencia el desplazamiento del GDP por GTP. La proteínas G entonces activan un sistema enzimático que produce señales químicas intracelulares llamadas segundos mensajeros. Uno de los segundos mensajeros más comunes es el AMP cíclico, sintetizado cuando la enzima adenilato ciclasa es activada por una proteína G. En una vía alternativa, los segundos mensajeros son el inositol trifosfato y el diacilglicerol, que son producidos a partir de fosfatidil inositol bifosfato cuando una

proteína G activa a la enzima fosfolipasa C. Independientemente de la vía, los segundos mensajeros median respuestas intracelulares específicas mediante la activación de enzimas o cascadas enzimáticas específicas.

Los iones de calcio desempeñan un papel central en procesos de activación celular y se pueden considerar también como segundos mensajeros. Los efectos del calcio están mediados frecuentemente por la calmodulina, una proteína que se activa cuando se unen a ella iones calcio. Dependiendo de la célula diana, el complejo calcio calmodulina puede activar una enzima dentro de una gran variedad de enzimas posibles, modulando por lo tanto la actividad enzimática en respuesta a la concentración de calcio citosólica. La liberación de calcio a partir de las reservas del retículo endoplásmico inducida por IP_3 es un paso importante en muchos procesos de señalización, incluyendo la fertilización de óvulos animales.

Los receptores proteína kinasa, como los receptores tirosina kinasa, actúan a través de una tercera categoría de mecanismos de transducción de señal. Cuando se une el ligando apropiado, estos receptores se fosforilan en tirosinas específicas. El receptor fosforilado se transforma en un sitio de unión para otras proteínas que contienen dominios SH2. Cuando estas proteínas se unen al receptor, son activadas por la propia unión o por la posterior fosforilación. Las proteínas que contienen dominios SH2 activan vías principales de transducción de señal incluyendo a Ras y a la fosfolipasa C.

Los factores de crecimiento son mensajeros que desempeñan un papel específico en la regulación del crecimiento y el comportamiento celular. Muchos factores de crecimiento se unen a receptores tirosina kinasa; otros factores de crecimiento tienen actividad serina/treonina kinasa. En éstos y en otros casos, la señal de los eventos de transducción produce alteraciones en la fosforilación de proteínas citosólicas, lo que en último lugar regula cambios en la función de proteínas que entran en el núcleo y que afectan a la expresión génica. Las vías de transducción de señal iniciadas por estos tipos diferentes de receptores proporcionan información importante para nuestra comprensión del desarrollo embrionario. Las mutaciones pueden conducir a actividades no reguladas o a la falta de función del receptor o de otros componentes de la vía de transducción de señal. Como consecuencia, las células pueden sufrir cambios en los estímulos que perciben que pueden conducir a una función anormal e incluso al cáncer.

Las hormonas son mensajeros que regulan diversas actividades de tejidos corporales distantes a los tejidos que las secretan. Las hormonas pueden ser endocrinas o paracrinas, dependiendo de su modo de liberación. Las hormonas adrenérgicas, secretadas por la médula de la glándula adrenal, son ejemplos de hormonas endocrinas. Los receptores de hormonas adrenérgicas se pueden clasificar como receptores adrenérgicos α y β. Los receptores β-adrenérgicos están acoplados a proteínas G y estimulan la formación de cAMP, mientras que los receptores α-adrenérgicos estimulan a la fosfolipasa C, lo que produce una elevación de la concentración de calcio intracelular. Los distintos receptores median efectos opuestos en diferentes tipos de músculo liso, pero funcionan para coordinar los cambios en el flujo sanguíneo y otras actividades, preparando por lo tanto al organismo para situaciones estresantes.

La apoptosis es una forma de suicidio celular que puede ser desencadenada por señales externas o por cambios internos en una célula, como alteraciones en su DNA. La apoptosis implica el desmantelamiento ordenado de los contenidos de la célula que está muriendo, incluyendo la fragmentación del ADN y del citoplasma, lo que eventualmente produce la muerte de la célula y eliminación de sus restos mediante células fagocíticas. Las proteínas específicas llamadas caspasas son elementos clave que median en el proceso de apoptosis. Las caspasas se pueden activar de distintas formas; una ruta principal de activación es a través de la liberación de citocromo *c* desde las mitocondrias.

Problemas

Los problemas de mayor dificultad están marcados con un •.

14.1 Señales químicas y segundos mensajeros. Rellene los espacios en blanco con los términos apropiados.

(a) ______ es una proteína intracelular que une calcio y activa enzimas.

(b) La ______ es una glándula que regula otros tejidos endocrinos del cuerpo.

(c) Una sustancia que encaja en el sitio específico de unión de una molécula de proteína de la superficie de la célula se llama un ______.

(d) Los dos productos de la actividad fosfolipasa C que pueden servir como segundos mensajeros son el ______ y el ______.

(e) El AMP cíclico es producido por la enzima ______ y degradado por la enzima ______.

14.2 Proteínas G monoméricas y heterotriméricas. Los receptores acoplados a proteínas G activan proteínas G heterotriméricas a través de interacciones entre el receptor y la subunidad $G_{\beta\gamma}$. Después de la unión al receptor, la subunidad $G_{\beta\gamma}$ cataliza el intercambio GDP/GTP por la subunidad G_{α}. ¿En qué se parece esto a la activación de Ras por un receptor tirosina kinasa?

•14.3 ¿Por qué calcio? Compare la utilización de iones sodio (*véase* Capítulo 13) y calcio como señales intracelulares.

(a) ¿Qué sucede si entra sodio en la célula? ¿Qué sucede si se eleva a la concentración citosólica de calcio? ¿Cuál es la diferencia?

(b) ¿Por qué podría ser mejor emplear iones calcio en lugar que iones sodio como segundos mensajeros si el ion se debe unir a una proteína como parte de una vía de transducción de señal?

14.4 Quelantes de calcio e ionóforos. Los *quelantes de calcio* y los *ionóforos calcio* son dos herramientas importantes que han ayudado estudiar el papel del calcio en la iniciación de diferentes procesos celulares. Los quelantes son compuestos como EGTA y EDTA que se unen con mucha afinidad a los iones calcio reduciendo así de manera efectiva la concentración

de iones calcio libres (o disponibles) fuera de la célula casi hasta cero. Los ionóforos son compuestos que transportan iones a través de las bicapas lipídicas y las membranas, incluyendo la membrana plasmática y las membranas internas como la del ER. Para los iones calcio, dos de los ionóforos empleados más comúnmente son el A23187 y la ionomicina. Describa cómo demostraría usted empleando estas herramientas que una hormona ejerce su efecto a través de (1) la inducción de la entrada de calcio en la célula a través de canales, o (2) liberando calcio desde reservorios intracelulares como el ER.

•**14.5** Consulte el Anexo 14A para esta cuestión. Recuerde que cada omatidio en el ojo compuesto está formado por una célula fotorreceptora, R7, que para diferenciarse debe recibir la señal de una celular vecina, R8. Esta vía depende de la vía de señalización de Ras. Recuerde también que los científicos pueden aislar mutantes que nos permiten profundizar en el conocimiento de esta vía. Para cada una de las siguientes situaciones describa si esperaría que R7 pudiese o no diferenciarse. En cada caso, explique su razonamiento en base a su comprensión de la vía molecular.

(a) Las células R7 están mutadas de forma que sus receptores *sevenless* carecen del dominio de unión SH2.

(b) Las células R7 están mutadas de forma que carecen de Sos funcional, pero contienen una mutación dominante «constitutivamente activa» de Ras.

(c) Las células R7 están mutadas de forma que tienen una MAP kinasa no funcional.

(d) Las células R8 están mutadas de forma que producen demasiado ligando de unión a *sevenless* y las células R7 carecen de *sevenless*.

14.6 **Medicina y receptores de membrana.** *La hipertensión* o presión sanguínea elevada es frecuente en ancianos. Un tratamiento que se prescribe generalmente para reducir la presión sanguínea del paciente incluye a los compuestos llamados *beta-bloqueantes,* que bloquean los receptores β-adrenérgicos por todo el cuerpo. Estos receptores unen adrenalina, activando a continuación una respuesta celular. ¿Por qué considera que los beta-bloqueantes son efectivos para reducir la presión sanguínea?

•**14.7** **Dobles negativos.** El mRNA que codifica para los receptores del factor de crecimiento fibroblástico dominantes negativos se inyecta en una o más células de embriones de rana. Vimos cómo en este experimento los receptores interfieren con la función de receptores normales (*véase* Figura 14.19). En algunos experimentos, se inyectó un exceso de mRNA normal del receptor nativo como control. ¿Por qué se hizo esto? ¿Podría la inyección de un exceso de mRNA normal del receptor nativo cancelar los efectos de los receptores mutados? Explique su respuesta.

14.8 **Receptores quimioatractivos en neutrófilos.** *Los neutrófilos* son células sanguíneas responsables normalmente de matar bacterias en los sitios de infección. Los neutrófilos son capaces de encontrar el camino hacia los sitios de infección mediante un proceso llamado *quimiotaxis.* En este proceso, los neutrófilos detectan la presencia de una proteína bacteriana mediante receptores en su membrana plasmática y a continuación siguen la senda de estas proteínas hacia el sitio de la infección. Suponga que descubre que la quimiotaxis es inhibida por la toxina pertúsica. ¿Qué tipo de receptor está probablemente implicado en la respuesta a las proteínas bacterianas?

14.9 **Una vez es suficiente.** Una persona que fuma por primera vez tiende a sentir los efectos del cigarrillo de manera mucho más severa que una persona que fuma frecuentemente. Ya que el tabaco contiene nicotina, dé una explicación razonable para esta diferencia.

•**14.10** **Huevos revueltos.** La liberación de calcio estimulada por proteínas G se ha propuesto como un mecanismo implicado en la activación de los huevos de la estrella de mar. Se puede inducir que los huevos de la estrella de mar produzcan proteínas extrañas mediante la inyección del mRNA que codifica la proteína de elección. ¿Cuál es su predicción de lo que sucederá en cada uno de los siguientes casos y por qué?

(a) Cuando se inyecta en un huevo sin fertilizar el mRNA que codifica una fosfolipasa β que está siempre activada.

(b) Cuando se inyecta mRNA para receptores que no permiten la liberación de calcio y el óvulo es entonces fertilizado.

(c) Cuando se inyecta aecuorina, una proteína natural de las medusas que emite fluorescencia en respuesta a niveles elevados de calcio, en huevos normales que son posteriormente fertilizados.

•**14.11** **Apoptosis y medicina.** Un objetivo importante de la medicina molecular es desencadenar o prevenir la apoptosis en células específicas. Se están seleccionando numerosos componentes de la vía apoptótica para actuar sobre ellos en ensayos clínicos. Indique específicamente para cada una de las siguientes aproximaciones como esperaría que el tratamiento estimularse o inhibiese la apoptosis.

(a) Tratamiento de las células con oligonucleótidos antisentido dirigidos contra el gen Bcl-2 (los oligonucleótidos antisentido se unen a los mRNAs, evitando su traducción a proteínas).

(b) Exponiendo las células a la proteína recombinante TRAIL que es un ligando para la familia de receptores del factor de necrosis tumoral.

(b) Tratamiento de las células con compuestos orgánicos que penetran en la célula y se pueden unir con alta afinidad al sitio activo de la caspasa-3.

Bibliografía recomendada

Las referencias con importancia histórica están marcadas con •.

Principios generales en señalización celular

Blume-Jensen, P. y T. Hunter. Oncogenic kinase signaling. *Nature* 411 (2001): 355.

Clapham, D. E. Mutations in G protein-linked receptors: Novel insights on disease. *Cell* 75 (1993): 1237.

Levitsky, A. *Receptors: A Quantitative Approach.* Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings, 1984.

Pawson, T. y P. Nash. Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* 300 (2003): 445.
Scott, J. D. y Pawson, T. Cell communication: the inside story. *Sci. Amer.* 282 (2000): 72.

Vías de transducción de señales: proteínas G y sistemas de mensajeros secundarios

Berridge M. J., M. D. Bootman y H. L. Roderick. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4 (2003): 517.
Brownlee, C. Cellular calcium imaging: So, what's new? *Trends Cell Biol.* (2000) 10: 451.
Head, J. F. A better grip on calmodulin. *Curr. Biol.* 2 (1992): 609.
•Levitsky, A. From epinephrine to cyclic AMP. *Science* 241 (1988): 800.
•Linder, M. E. y A. G. Gilman. G proteins. *Sci. Amer.* 267 (1992): 56.
Mikoshiba, K. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 14 (1993): 86.
•Sutherland, E. W. Studies on the mechanism of hormone action. *Science* 177 (1972): 401.
•Tang, W. J. y A. G. Gilman. Adenylyl cyclases. *Cell* 71 (1992): 1069.

Señalización por factores de crecimiento

De Moerlooze, L. y C. Dickson. Skeletal disorders associated with fibroblast growth factor receptor mutations. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7 (1997): 378.
Gilbert, S. F. *Developmental Biology,* 6th ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2000.
Massague, J. S., W. Blain y R. S. Lo. TGFβ signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103 (2000): 295.
Pawson T. Specificity in signal transduction: From phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* 116 (2004): 191.
•Rozakis-Adcock, M., R. Fernley, J. Wade, T. Pawson y D. Bowtell. The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb 2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature* 363 (1993): 83.
Schlessinger, J. How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem. Sci.* 18 (1993): 273.
Shi, Y. y J. Massague. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113 (2003): 685.

Fisiología y señalización celular

Maggi, M., S. Filippi, F. Ledda, A. Magini y G. Forti. Erectile dysfunction: from biochemical pharmacology to advances in medical therapy. *Eur. J. Endocrin.* 143 (2000): 143
Norman, A. W. y G. Litwack. *Hormones,* 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1997.
Waldeck, B. Beta-adrenoceptor agonists and asthma-100 years of development. *Eur. J. Pharmacol.* 445 (2002): 1.
Snyder, S. H. y D. S. Bredt. Biological roles for nitric oxide. *Sci. Amer.* 266 (1992): 68.

Modelos y señalización celular

Hariharan, I. K. y D. A. Haber. Yeast, flies, worms, and fish in the study of human disease. *N. Engl. J. Med.* 348 (2003): 2457.
Horvitz H. R. Worms, life, and death (Nobel lecture). *Chembiochem.* 4 (2003): 697.
Thomas, B. J. y D. A. Wassarman. A fly's eye view of biology. *Trends Genet.* 15 (1999): 184.

Señales celulares y apoptosis

Boatright, K. M. y G. S. Salvesen. Mechanisms of caspase activation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 15 (2003): 725.
Mattson, M. P. y S. L. Chan. Calcium orchestrates apoptosis. *Nat. Cell. Biol.* 5 (2003): 1041.
Opferman, J. T. y S. J. Korsmeyer. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat. Immunol.* 4 (2003): 410-5.
Vaux, D. y S. J. Korsmeyer. Cell death in development. *Cell* 96 (1999): 245.

15

El citoesqueleto

En los capítulos anteriores, hemos analizado multitud de procesos y rutas celulares, que tienen lugar en los orgánulos de células eucariotas. Nos ocuparemos ahora del citosol, que es la región del citoplasma que se encuentra alrededor y entre los orgánulos. Hasta hace unas pocas décadas, el citosol no suscitaba ningún interés en particular y se hacía referencia a él como una sustancia, similar a un gel, en la que estaban suspendidos el núcleo y otros orgánulos. Los biólogos celulares sabían que las proteínas constituían hasta el 20-30% del citosol, pero se pensaba que estas proteínas eran solubles y que eran capaces de moverse libremente. Aparte de aquéllas con actividad enzimática, se conocía poco de la importancia estructural o funcional de las proteínas citosólicas.

Los avances en la microscopía y en otras técnicas de investigación, han puesto de manifiesto, que el interior de una célula eucariota está altamente estructurado. Parte de esta estructura la proporciona el **citoesqueleto**: un entramado complejo de filamentos y túbulos interconectados que se extienden a lo largo del citosol, desde el núcleo hasta la cara interna de la membrana plasmática.

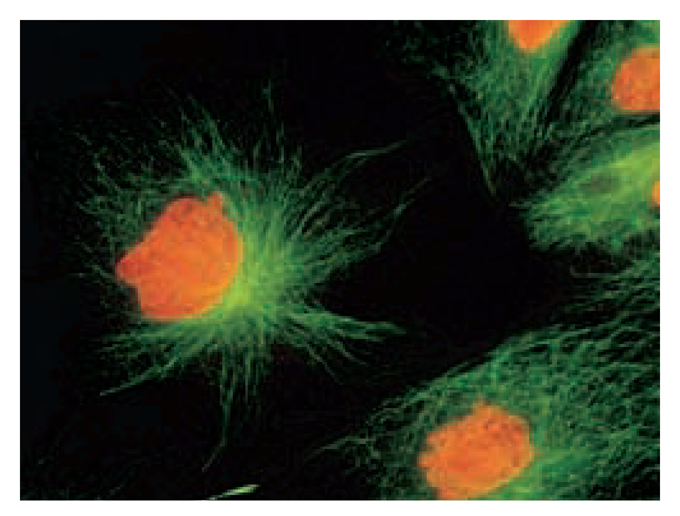
El término *citoesqueleto* expresa de una manera acertada la función de esta red de polímeros, que es la de proporcionar una estructura arquitectónica a las células eucariotas. Aporta un alto nivel de organización interna a las células y les permite asumir y mantener formas complicadas que no serían posibles de otra manera. El nombre no transmite, sin embargo, la naturaleza dinámica y plástica del citoesqueleto, ni el papel crítico que desempeña en muchos procesos celulares.

El citoesqueleto tiene un papel importante en el movimiento y en la división celulares, y posiciona y mueve activamente los orgánulos de membrana, dentro del citosol. Desempeña un papel similar con el ARN mensajero y otros componentes celulares. De hecho, muchas de las enzimas del citosol, seguramente no son solubles, sino que están físicamente unidas al citoesqueleto y confinadas muy cerca de las enzimas implicadas en la misma ruta, de tal manera que se facilita la canalización de intermediarios dentro de cada ruta. El citoesqueleto participa además en muchas formas de movimiento celular y está íntimamente relacionado con otros procesos, como la señalización celular o las uniones célula a célula. El citoesqueleto se altera por fenómenos que ocurren en la superficie celular y, al mismo tiempo, parece que participa y modula dichos fenómenos.

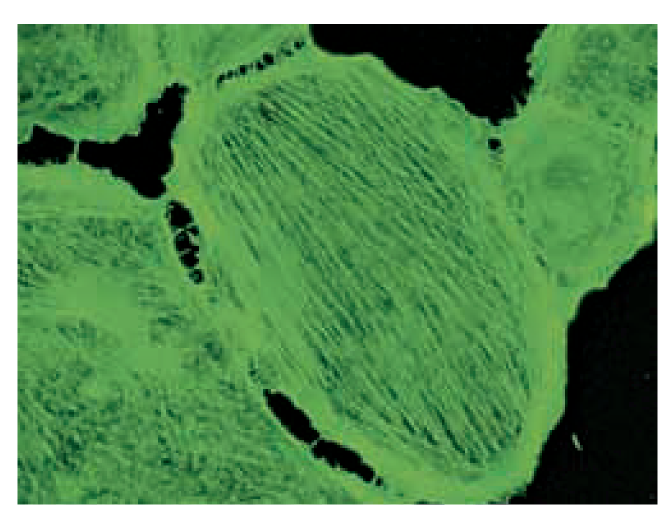
En este capítulo, nos centraremos en la estructura del citoesqueleto. En el Capítulo 16 analizaremos más detenidamente la función del citoesqueleto, poniendo especial atención en el movimiento celular.

Principales elementos estructurales del citoesqueleto

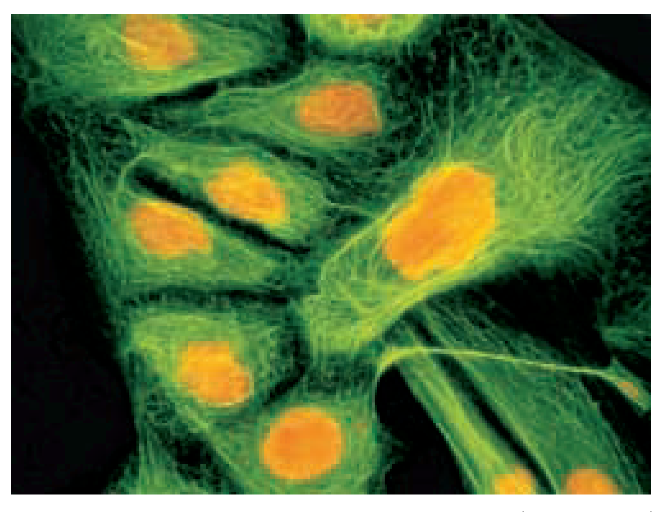
Los principales elementos estructurales del citoesqueleto son tres: *microtúbulos, microfilamentos* y *filamentos intermedios*, todos ellos exclusivos de células eucariotas (Figura 15.1). La existencia de tres sistemas distintos de filamentos y túbulos se puso de manifiesto por primera vez mediante microscopía electrónica. Posteriormente, se identificaron, mediante estudios bioquímicos e inmunológicos, las diferentes proteínas de cada sistema, que son también exclusivas de células eucariotas. La técnica de microscopía de inmunofluorescencia (Tabla 15.2; *véase* tam-



(a) Microtúbulos

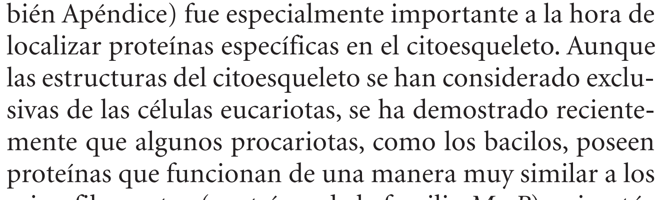


(b) Microfilamentos



(c) Filamentos intermedios

Figura 15.1 Distribución intracelular de microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios. (**a**) Imagen de la distribución de los microtúbulos en células de la línea celular PtK-1, de riñon de rata canguro, visualizados mediante la tinción inmunofluorescente de la tubulina. Como referencia, se ha teñido el núcleo con el colorante fluorescente rojo de ADN, ioduro de propidio. (**b**) Imagen de la distribución de los microfilamentos en células de la línea celular de riñon de rata, visualizados mediante la tinción de la actina con un derivado fluorescente de la faloidina. (**c**) Imagen de la distribución de los filamentos intermedios en las células PtK-1, marcados con la tinción inmunofluorescente de la queratina. El núcleo se ha teñido también aquí con ioduro de propidio.



bién Apéndice) fue especialmente importante a la hora de localizar proteínas específicas en el citoesqueleto. Aunque las estructuras del citoesqueleto se han considerado exclusivas de las células eucariotas, se ha demostrado recientemente que algunos procariotas, como los bacilos, poseen proteínas que funcionan de una manera muy similar a los microfilamentos (proteínas de la familia *MreB*), microtúbulos (la *proteína FtsZ*) y filamentos intermedios (una de ellas se denomina *crescentina*). Aunque las proteínas bacterianas no se parecen mucho a sus homólogas eucariotas, en lo que a la composición de aminoácidos se refiere, cuando se ensamblan en polímeros, su estructura general es bastante similar.

Cada uno de estos elementos estructurales del citoesqueleto tiene un tamaño, estructura y distribución intracelular características, y cada uno se origina por la polimerización de un tipo de subunidad diferente (Tabla 15.1). Los microtúbulos están compuestos por la proteína *tubulina* y tienen un diámetro de aproximadamente 25 nm. Los microfilamentos, con un diámetro de unos de 7 nm, son polímeros de la proteína *actina*. Los filamentos intermedios poseen un diámetro entre 8 y 12 nm. Las subunidades que componen los filamentos intermedios, difieren en función del tipo celular. Aparte de su proteína principal, cada clase de filamento del citoesqueleto presenta un número de proteínas asociadas. Estas proteínas accesorias son responsables de la notable diversidad estructural y funcional de los elementos del citoesqueleto.

Los microtúbulos y los microfilamentos son más conocidos por el papel que desempeñan en la movilidad celular. Los microfilamentos son componentes esenciales de las fibrillas musculares, y los microtúbulos son los elementos estructurales de los *cilios* y los *flagelos*, apéndices que capacitan a la célula, tanto para desplazarse a través de un medio fluido, como para batir el medio extracelular. Estas estructuras son lo suficientemente grandes como para ser vistas mediante microscopía óptica y, por lo tanto, se conocían y fueron estudiadas mucho antes de que se aclarase

Tabla 15.1 Propiedades de los microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios

	Microtúbulos	Microfilamentos	Filamentos intermedios
Estructura	Tubo hueco con una pared formada por 13 protofilamentos	Dos cadenas de actina entrelazadas	Ocho protofilamentos unidos extremo a extremo, con solapamientos escalonados
Diámetro	Exterior: 25 nm Interior: 15 nm	7 nm	8-12 nm
Monómeros	Tubulina α Tubulina β	G-actina	Varias proteínas; *véase* Tabla 15.5
Polaridad	Extremos (+), (−)	Extremos (+), (−)	Sin polaridad conocida
Funciones	Axonema: motilidad celular Citoplásmica: organización y mantenimiento de la forma de la célula animal Movimiento de los cromosomas Disposición y movimiento de los orgánulos	Contracción muscular Movimiento ameboide Locomoción celular Flujos, corrientes citoplásmica División celular Mantenimiento de la forma de la célula animal	Soporte estructural Mantenimiento de la forma de la célula animal Formación de la lámina nuclear y el andamiaje Reforzamiento de los axones de las células nerviosas (proteína NF) Mantenimiento de las fibras musculares en registro (desmina)

que los mismos elementos estructurales eran también partes integrales del citoesqueleto.

Consideraremos detalladamente cada elemento estructural. Para ello, trataremos a los microtúbulos, los microfilamentos y los filamentos intermedios como si fuesen entidades separadas, cada una de ellas con una función propia independiente. Sin embargo, recuerde que los componentes del citoesqueleto están vinculados, tanto estructural como funcionalmente, lo que genera nuevas propiedades arquitectónicas que no son simplemente la suma de las partes, como veremos en la última sección de este capítulo.

Técnicas para el estudio del citoesqueleto

Las técnicas modernas de microscopía han revolucionado el estudio del citoesqueleto

Actualmente, el citoesqueleto es un tema de gran interés para los biólogos celulares. Gran parte del progreso reciente en la comprensión de la estructura del citoesqueleto, se debe a tres técnicas microscópicas de gran potencia: microscopía de inmunofluorescencia, videomicroscopía digital y microscopía electrónica. La Tabla 15.2 resume cada una de estas técnicas, que se describirán más en detalle en el Apéndice. Además, se han empleado drogas y mutaciones específicas, que han sido de gran utilidad para el análisis de la función del citoesqueleto.

Se pueden usar ciertas drogas y mutaciones para desorganizar las estructuras citoesqueléticas

Aunque las técnicas microscópicas pueden desvelar mucho acerca de la estructura del citoesqueleto, no nos permiten deducir mucho acerca de su función. Para analizar la función de un filamento del citoesqueleto en particular, debemos quitar o alterar selectivamente la función de las proteínas relevantes: en el caso de la tubulina y de la actina, podemos usar ciertas sustancias para alterar la función de la proteína en un sentido determinado. Mediante el estudio de los efectos de dichas drogas en procesos celulares específicos, es posible determinar, al menos aproximadamente, las funciones que dependen de los microtúbulos o de los microfilamentos.

Por ejemplo, la *colchicina* (un alcaloide que se obtiene del azafrán silvestre, *Colchicum autumnale*), se une a los monómeros de tubulina, inhibiendo su ensamblaje en microtúbulos y fomentando el desensamblaje de los que ya existen. Por el contrario, el *taxol* (del tejo americano, *Taxus brevifolia*) se une fuertemente a los microtúbulos y los estabiliza, provocando que gran parte de la tubulina libre en la célula se asocie para formar microtúbulos. Por lo tanto, la sensibilidad de un proceso celular a la colchicina o al taxol, es un buen indicio de que los microtúbulos podrían intervenir en dicho proceso en la célula. De una manera similar, la sustancia *citocalasina D*, un metabolito fúngico y la *latrunculina A*, una toxina marina que se aísla de la esponja del mar Rojo, *Latrunculia magnifica*, inhiben la polimerización de los microfilamentos de actina. Por el contrario, la *faloidina* un péptido cíclico obtenido del hongo oronja verde (*Amanita phalloides*), bloquea la depolimerización de la actina, y estabilizando los microfilamentos. Los procesos que se ven interrumpidos en las células con el tratamiento con estas sustancias probablemente dependan de alguna manera de los microfilamentos. Los usos y los efectos de estas sustancias se discutirán detalladamente a lo largo del capítulo.

Además del empleo de sustancias, también nos podemos servir de las mutaciones para estudiar el citoesqueleto. Los biólogos celulares, mediante el uso de la genética y la biología molecular, han aislado organismos mutantes o líneas celulares en los que se han introducido mutaciones específicas en una proteína determinada del citoesqueleto.

Tabla 15.2 Técnicas para el estudio del citoesqueleto

Técnica	Descripción	Ejemplo	
Microscopía de inmunofluorescencia	Los anticuerpos primarios se unen a las proteínas del citoesqueleto. Los anticuerpos secundarios, marcados con fluoróforos, se unen a los primarios, haciendo que las proteínas del citoesqueleto brillen en el microscopio de fluorescencia.	Los haces de filamentos de actina son patentes en un fibroblasto teñido con anticuerpos fluorescentes, generados contra la actina.	Figura 1
Técnicas fluorescentes para estudiar el citoesqueleto en células vivas	Se generan versiones de las proteínas del citoesqueleto y se introducen en las células vivas. Se usan la microscopía fluorescente y las cámaras de vídeo o digitales, para ver cómo funcionan las proteínas en las células.	Se microinyectan moléculas de tubulina fluorescentes en fibroblastos vivos. Dentro de la célula, los dímeros de tubulina se incorporan a los microtúbulos, que pueden ser vistos fácilmente con un microscopio de fluorescencia.	Figura 2
Microscopía de vídeo digital computerizada	Se procesan con el ordenador imágenes de alta resolución tomadas con una cámara de vídeo o digital unida a un microscopio, con el fin de aumentar el contraste y eliminar el fondo, que oscurece la imagen.	Procesamiento de dos micrografías que muestran varios microtúbulos, para que puedan verse en detalle.	Figura 3 Sin mejorar / Mejorada
Microscopía electrónica	La microscopía electrónica permite visualizar filamentos individuales, procesados mediante técnicas de corte finos, de criograbado o de montaje directo.	Fibroblasto preparado mediante la técnica de criograbado. Se ven los haces de microfilamentos de actina.	Figura 4

Dichas mutaciones han sido útiles para indentificar los procesos celulares que requieren la participación de proteínas del citoesqueleto y para elucidar qué partes de dicha proteína son necesarias para su función.

Teniendo presentes estas técnicas, estamos ahora preparados para tratar cada uno de los tres componentes principales del citoesqueleto. En cada caso, consideraremos la química de la(s) subunidad(es), la estructura del polímero, el modo de polimerización, la función de las proteínas accesorias y algunos de los papeles estructurales y funcionales que desempeña cada componente dentro de la célula. Trataremos en primer lugar los microtúbulos.

Microtúbulos

Existen dos tipos de microtúbulos que son responsables de muchas funciones en la célula

Los microtúbulos (MTs) son los elementos del citoesqueleto más grandes (Tabla 15.1). Los microtúbulos de las células eucariotas pueden ser clasificados en dos grandes grupos, que se diferencian, tanto por su grado de organización, como por su estabilidad estructural.

El primer grupo, los **microtúbulos del axonema**, incluye a los microtúbulos altamente organizados y estables que se encuentran en estructuras subcelulares específicas, relacionadas con el movimiento celular, como los cilios, los flagelos y los corpúsculos basales a los que se unen estos apéndices. El elemento central, o *axonema*, de un cilio o de un flagelo está formado por un haz muy ordenado de MTs del axonema y proteínas asociadas. Debido a su estabilidad y ordenamiento, no es sorprendente que los MTs del axonema fuesen el primero de los dos grupos en ser descubierto y estudiado. Ya hemos visto previamente un ejemplo de dicha estructura; el axonema de la cola del espermatozoide de la Figura 4.12, está formado por MTs. En el Capítulo 16 consideraremos más detalladamente la estructura del axonema y los movimientos mediados por los microtúbulos.

El segundo grupo lo forma una red más laxa y dinámica de **microtúbulos citoplásmicos.** Los MTs citoplásmicos no fueron descubiertos en las células eucariotas hasta principios de la década de 1960, con la aparición de mejores técnicas de fijación, que permitieron la observación de una red de MTs, que hoy en día se sabe que predominan en el citosol de la mayoría de las células eucariotas. A partir de ese momento, la microscopía de fluorescencia ha mostrado la diversidad y la complejidad de las redes de MTs en diferentes tipos celulares.

Los MTs citoplásmicos desempeñan varias funciones (*véase* Tabla 15.1). Por ejemplo, son necesarios en las células animales para el mantenimiento de los axones, prolongaciones de las células nerviosas, cuyas propiedades eléctricas hemos examinado ya en el Capítulo 13. Algunas células animales necesitan los MTs citoplásmicos para mantener su forma polarizada durante su migración. Se piensa que en las células vegetales, los MTs citoplásmicos regulan la orientación con la que se depositan las microfibrillas de celulosa durante el crecimiento de las paredes celulares. Es particularmente importante el papel de los MTs citoplásmicos en la formación de los husos mitóticos y meióticos, que son esenciales para el movimiento de los cromosomas durante la mitosis y la meiosis (*véase* Capítulo 19).

Los microtúbulos citoplásmicos contribuyen asimismo a la disposición espacial y al movimiento direccional de vesículas y de otros orgánulos, proporcionando un sistema de fibras organizado, que guía su movimiento. Por ejemplo, los MTs citoplásmicos ayudan a establecer la localización de orgánulos como el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico, y están implicados en el movimiento activo de vesículas (*véase* Capítulo 16).

Los heterodímeros de tubulina son las proteínas con las que se construyen los microtúbulos

Como se ha mencionado en el Capítulo 4, los MTs son cilindros rectos y huecos con un diámetro exterior cercano a los 25 nm y un diámetro interior de aproximadamente 15 nm (Figura 15.2). Los microtúbulos pueden variar enormemente en longitud. Algunos miden menos de 200 nm de largo; otros, como los microtúbulos del axonema, pueden llegar a medir de varios micrómetros. La pared de los microtúbulos está formada por un conjunto de polímeros lineales llamados **protofilamentos**. Normalmente hay 13 protofilamentos, colocados uno al lado del otro, alrededor del hueco central o lumen.

Como se muestra en la Figura 15.2, la subunidad básica de un protofilamento es un heterodímero de la proteína **tubulina**. Los heterodímeros que constituyen la mayor parte de los protofilamentos están compuestos por una molécula de **tubulina α** y una molécula de **tubulina β**. Tan pronto como se sintetizan las moléculas individuales de tubulina α y β, éstas se unen no covalentemente una a la otra para producir un **heterodímero $\alpha\beta$** que no se disocia en condiciones normales.

Las moléculas de tubulina α y β tienen un diámetro aproximado de 4-5 nm y un peso molecular de 55 kDa. En diversos estudios estructurales se ha comprobado que las tubulinas α y β tienen casi las mismas estructuras tridimensionales, a pesar de que sólo comparten el 40% de su secuencia de aminoácidos. Cada una se pliega en tres dominios: un dominio en el extremo N-terminal, que une GTP, un dominio central, donde puede unirse el inhibidor de la polimerización de los microtúbulos, la colchicina y un tercer dominio en el extremo C terminal, que interacciona con las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs; hablaremos más tarde de las MAPs en este capítulo).

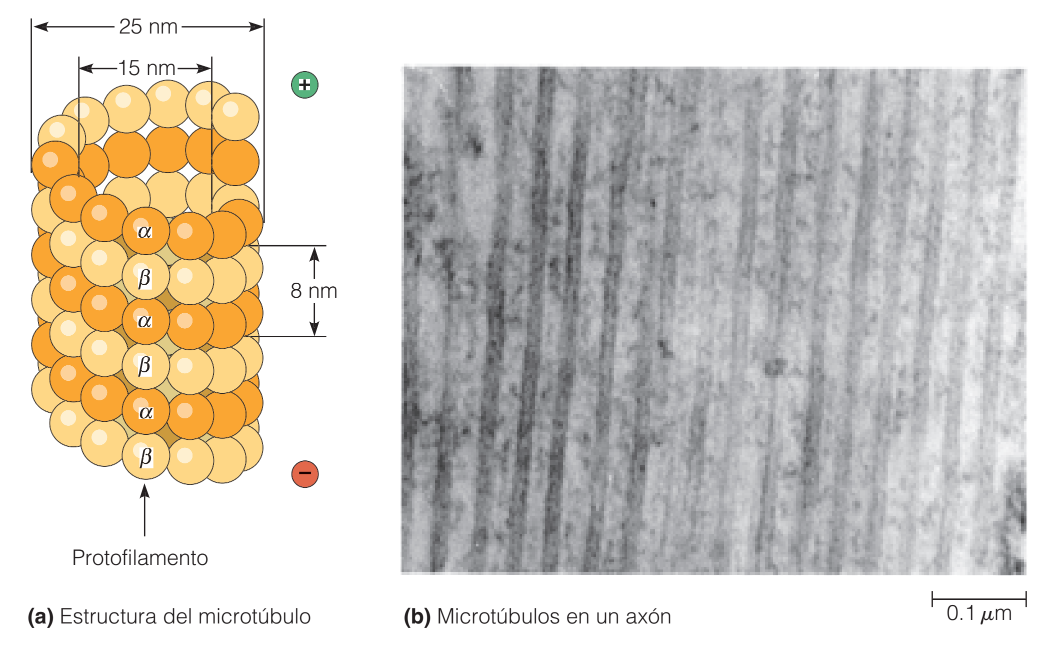


Figura 15.2 **Estructura de un microtúbulo.** (**a**) Diagrama esquemático en el que se muestra un microtúbulo como un cilindro hueco que encierra una luz. El diámetro externo es de aproximadamente 25 nm y el interno, de unos 15 nm. La pared del cilindro está formada por 13 protofilamentos, la flecha señala uno de ellos. Un protofilamento es un polímero lineal de dímeros de tubulina, cada uno de los cuales está constituido por dos polipétidos, tubulina α y β. Todos los heterodímeros de los protofilamentos poseen la misma orientación, proporcionando de esta manera la polaridad al microtúbulo. (**b**) Microtúbulos en un corte longitudinal de un axón (TEM).

En el interior de un microtúbulo, todos los dímeros de tubulina están orientados en la misma dirección, de manera que todas las subunidades de tubulina α exponen el mismo extremo. Esta orientación uniforme de los dímeros de tubulina provoca que un extremo del protofilamento difiera química y estructuramente del otro, lo que confiere una polaridad inherente al protofilamento. La orientación de los dímeros de tubulina es la misma en todos los protofilamentos de un mismo microtúbulo, lo que confiere al propio microtúbulo una estructura polar.

La mayoría de los organismos poseen varios genes muy relacionados, aunque no indénticos para cada subunidad α y β de tubulina. Estas formas de tubulina ligeramente diferentes se denominan *isoformas de la tubulina*. Por ejemplo, en el cerebro de los mamíferos existen cinco isoformas de la tubulina α y cinco isoformas de la β. Estas isoformas difieren principalmente en el dominio C Terminal, la parte de la tubulina que se une a las MAPs. Esto implica que las diferentes isoformas de la tubulina poseerán diferentes propiedades de unión a las MAPs. Sin embargo, no se ha estudiado directamente en la mayoría de los casos, si las distintas isoformas tienen o no propiedades funcionales características.

Los microtúbulos se forman mediante la incorporación de dímeros de tubulina en sus extremos

Los microtúbulos se forman por el ensamblaje reversible de los dímeros de tubulina. El proceso de polimerización ha sido estudiado ampliamente in vitro; en la Figura 15.3 se muestra una representación esquemática del ensamblaje de un microtúbulo in vitro. La reacción de polimerización comienza cuando se calienta una solución que contiene una cantidad suficiente de dímeros de tubulina, GTP y Mg^{2+}, desde 0 °C hasta 37 °C. (La formación de MT en la solución puede observarse fácilmente en un espectrofotómetro como un aumento en la dispersión lumínica.) La agregación de los dímeros de tubulina en agrupaciones denominadas *oligómeros*, representa una etapa crucial en la formación de los microtúbulos. Estos oligómeros constituyen un «núcleo» a partir del cual pueden crecer los microtúbulos, por lo que se conoce a este proceso como **nucleación**. Una vez que se ha nucleado, el microtúbulo crece mediante la adición de subunidades en ambos extremos, un proceso denominado **elongación**.

La formación de los microtúbulos es lenta al principio, en lo que se conoce como la fase inicial lenta del ensamblaje de los microtúbulos (Figura 15.4). Este periodo refleja la relativa lentitud del proceso de nucleación de los microtúbulos. La fase de elongación —es decir, la adición de dímeros de tubulina— es relativamente rápida, comparada con la nucleación. Finalmente, la masa de los microtúbulos aumenta hasta un punto en el que la concentración de tubulina libre es limitante. Esto conduce a la fase de equilibrio, en la que la polimerización de los microtúbulos se encuentra en equilibrio con la depolimerización.

El crecimiento in vitro de los microtúbulos depende de la concertación de los dímeros de tubulina, de tal manera que el microtúbulo crece cuando la concentración de tubulina es alta y se despolimeriza cuando las concentraciones de tubulina son bajas. En algún punto entre estas dos

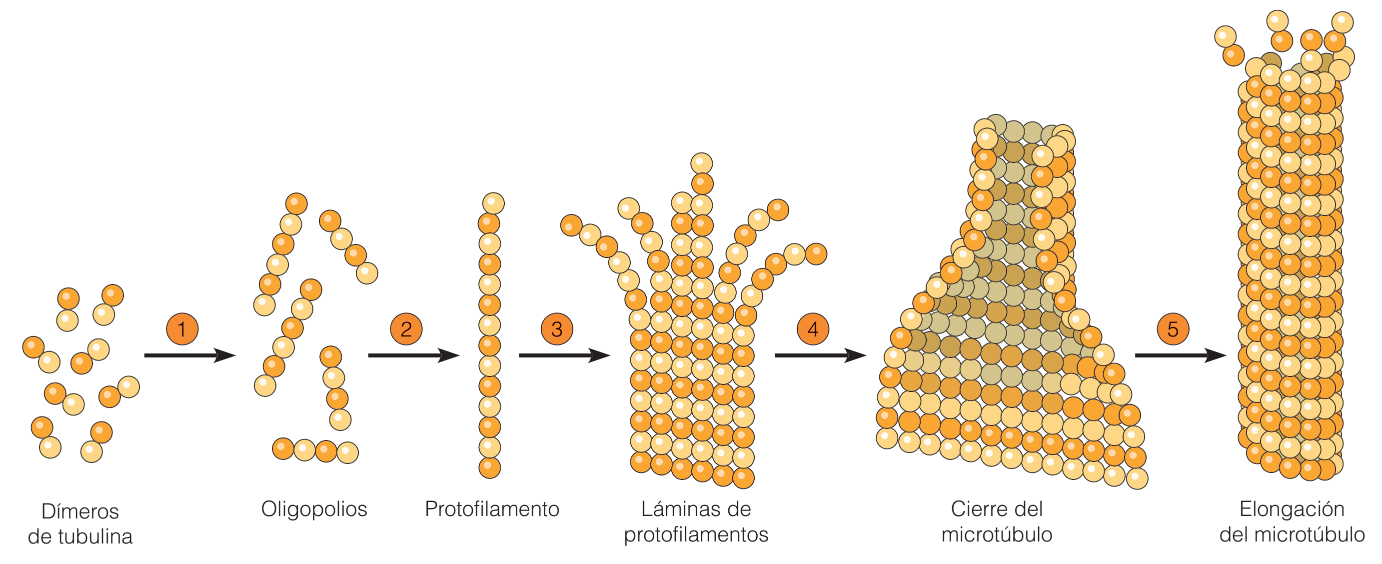


Figura 15.3 Modelo del ensamblaje de los microtúbulos in vitro. Los microtúbulos se forman a partir de subunidades compuestas por una molécula de tubulina α y una molécula de tubulina β, unidas fuertemente formando un dímero, denominado heterodímero de tubulina αβ o, simplemente, dímero de tubulina. ① En el inicio del proceso de nucleación, se pueden agregar varios dímeros de tubulina, en agrupaciones denominadas oligómeros. ② Algunos de ellos comienzan a formar cadenas lineares de dímeros de tubulina llamadas protofilamentos. ③ Los protofilamentos pueden asociarse después uno al lado del otro formando láminas. ④ Las láminas, que contienen 13 o más protofilamentos pueden cerrarse en un tubo, formando un microtúbulo. ⑤ La elongación del microtúbulo continúa con la agregación de subunidades de tubulina en uno o en ambos extremos.

condiciones se encuentra una concentración de tubulina en la que la polimerización está en perfecto equilibrio con la depolimerización. La concentración de los dímeros en este punto se denomina **concentración crítica** global.

La incorporación de los dímeros de tubulina tiene lugar con mayor rapidez en los extremos «más» de los microtúbulos

La polaridad estructural inherente a los microtúbulos es debida que los dos extremos difieren químicamente. Otra diferencia importante entre los extremos es que uno de ellos crece o se encoge mucho más rápidamente que el otro. Esta diferencia en la tasa de polimerización, puede visualizarse fácilmente mezclando las estructuras asociadas de los microtúbulos que se encuentran en la base de los cilios, llamados *corpúsculos basales*, con heterodímeros de tubulina. Los corpúsculos basales sirven de núcleo para la polimerización en ambos extremos, pero los MTs crecen mucho más rápidamente por un extremo que por el otro. (La posición del corpúsculo basal en un microtúbulo en

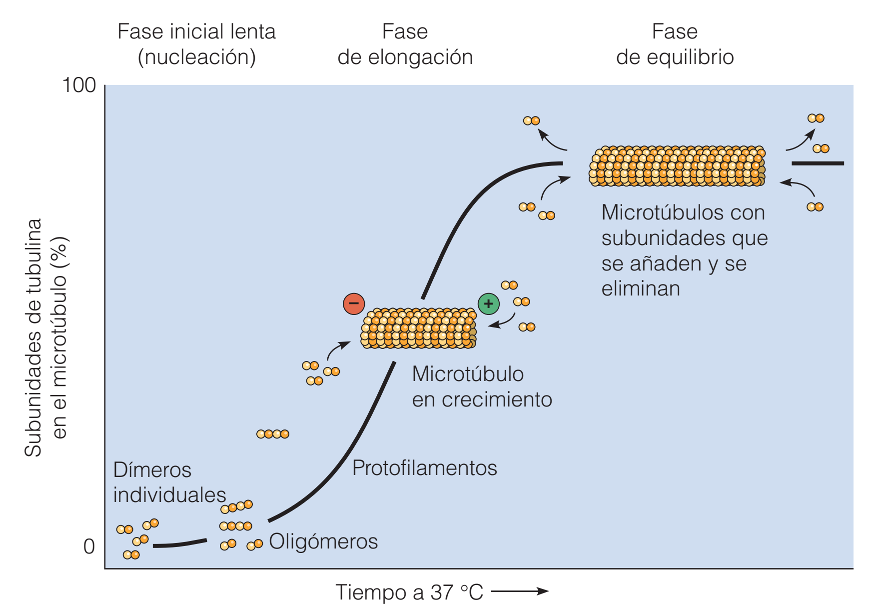


Figura 15.4 Cinética de la polimerización de los microtúbulos in vitro. La cinética del ensamblaje de los MT puede seguirse observando la cantidad de luz dispersada por una solución que contiene GTP-tubulina *después* de calentarla de 0 °C a 37 °C. (La polimerización de los microtúbulos se inhibe por frío y se activa por calor). Las medidas de la dispersión de la luz reflejan cambios en la población total de MTs y no la polimerización de microtúbulos individuales. Si se miden de esta manera, la polimerización de los microtúbulos presenta tres fases: inicial lenta, elongación y de equilibrio. La fase de retraso corresponde a la nucleación. Durante la fase de elongación los microtúbulos crecen rápidamente, haciendo que la concentración de subunidades de tubulina libre decline. Cuando esta concentración es lo suficientemente baja como para limitar la polimerización, se alcanza la fase de meseta, donde se añaden y eliminan subunidades de los microtúbulos con una tasa equivalente.

crecimiento puede establecerse por su aspecto diferente al microscopio electrónico; Figura 15.5). El extremo de crecimiento rápido del microtúbulo se denomina **extremo más**, siendo el otro, el **extremo menos**.

Las diferentes tasas de crecimiento en los extremos *más* y *menos* refleja diferencias en las concentraciones críticas que se requieren para la polimerización en ambos extremos del microtúbulo; la concentración crítica en el extremo *más* es menor que en el extremo *menos*. Si la concentración de tubulina libre es mayor que la concentración crítica para el extremo *más* pero menor que la concentración crítica para el extremo *menos*, entonces tendrá lugar la polimerización en el extremo *más*, y la depolimerización en el extremo *menos*. Este ensamblaje y desensamblaje simultáneo produce el fenómeno conocido como **recambio rotatorio** (Figura 15.6). El recambio rotatorio surge cuando una determinada molécula de tubulina que se incorpora en el extremo *más*, se desplazada progresivamente a lo largo del microtúbulo y finalemente se pierde, mediante depolimerización, por el extremo *menos*.

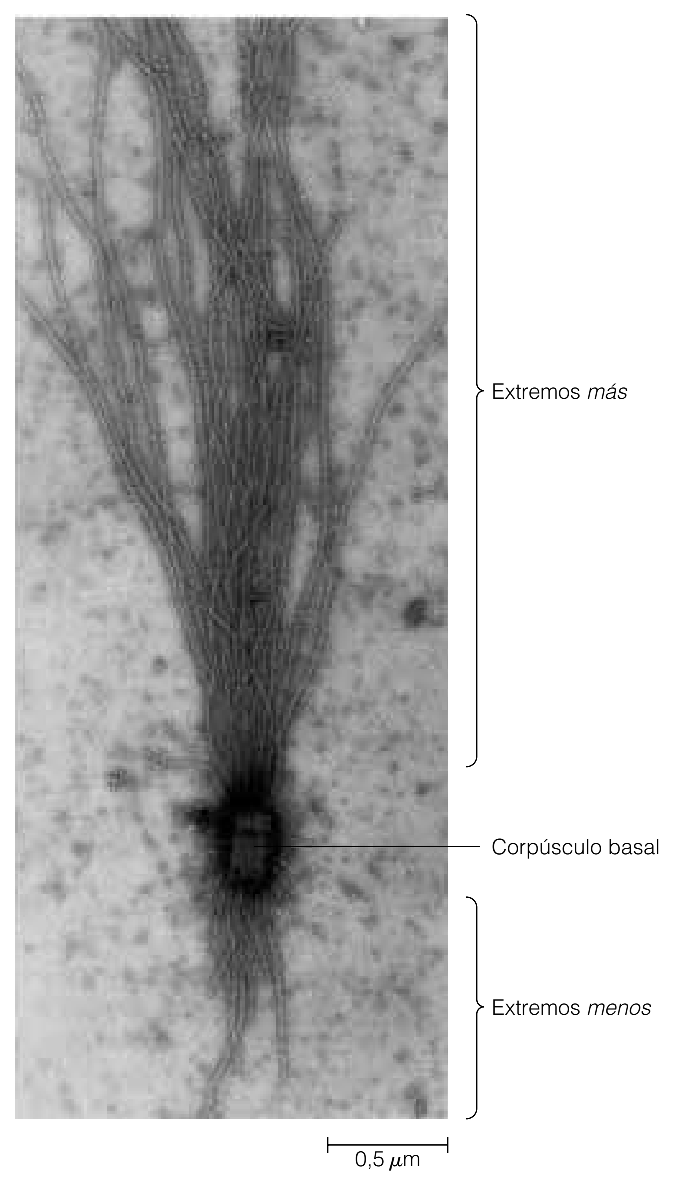


Figura 15.5 Ensamblaje polar de los microtúbulos in vitro. Se puede demostrar la polaridad en el ensamblaje de los MTs, añadiendo corpúsculos basales a una solución con dímeros de tubulina. Los dímeros de tubulina se añaden a los extremos *más* y *menos* de los microtúbulos del corpúsculo basal. Sin embargo, los MTs que crecen desde el extremo *más* son mucho más largos que aquellos que crecen desde el extremo *menos*.

La hidrólisis de GTP contribuye a la inestabilidad dinámica de los microtúbulos

En el apartado anterior, vimos que la tubulina puede polimerizar in vitro en presencia de Mg^{2+} y GTP. De hecho, el GTP es necesario para el ensamblaje de los MT. Cada heterodímero de tubulina une dos moléculas de GTP. La tubulina α une uno de los GTPs; el otro lo une la tubulina β, y puede hidrolizarse a GDP instantes después de que se añada el heterodímero al MT. Aparentemente se requiere GTP para la polimerización de los MT, ya que la asociación entre dímeros de tubulina unidos a GDP es demasiado débil como para soportar la polimerización. Sin embargo, la hidrólisis de GTP no es imprescindible para el ensamblaje, como se demuestra en experimentos en los que los microtúbulos se hacen polimerizar a partir de tubulinas unidas a un análogo no hidrolizable de GTP.

Los estudios de la polimerización de los MTs in vitro utilizando como centros de nucleación centrosomas aislados (una estructura que se tratará con detalle más adelante) muestran que algunos microtúbulos pueden crecer por polimerización al mismo tiempo que otros se encogen

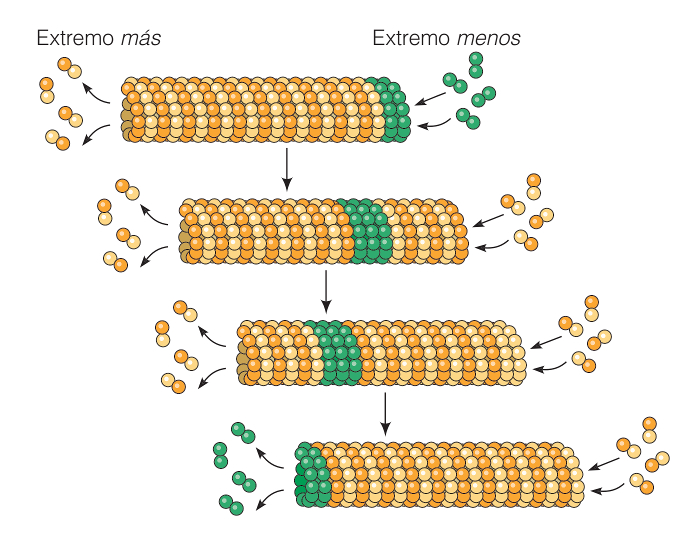


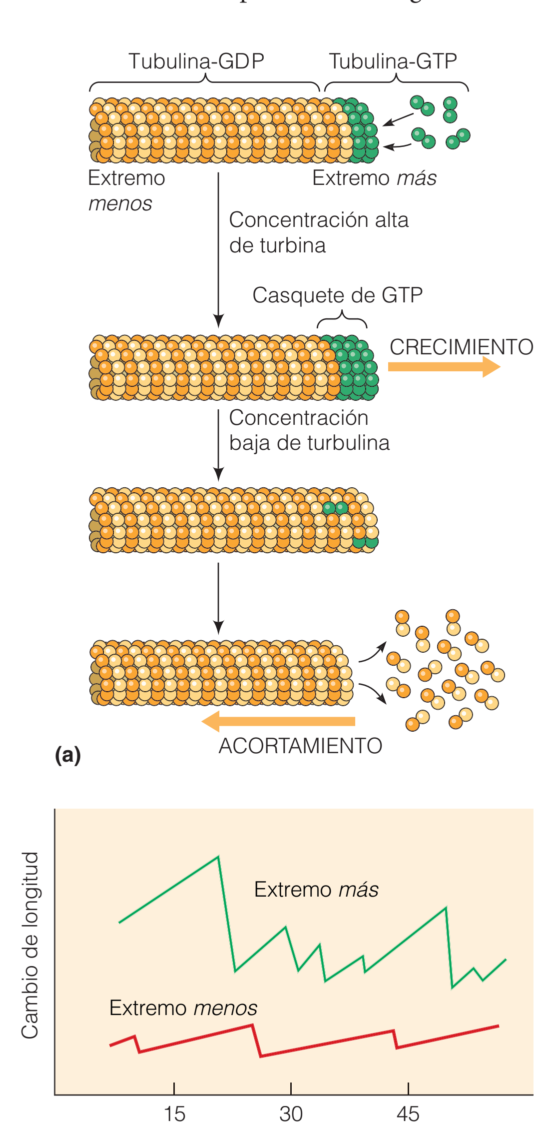
Figura 15.6 Cinta sin fin de los microtúbulos. La polimerización de los microtúbulos ocurre más rápidamente en el extremo *más* del MT que en el *menos*. Cuando la concentración de tubulina es mayor que la concentración crítica para el extremo *más*, pero menor que la concentración crítica para el extremo *menos*, el microtúbulo puede añadir heterodímeros de tubulina a su extremo *más*, mientras que los pierde por su extremo *menos*.

por depolimerización. Tanto es así que algunos microtúbulos de hecho, crecen a expensas de otros.

Para explicar cómo la polimerización y la depolimerización pueden ocurrir simultáneamente, Tim Mitchison y Mark Kirschner propusieron el **modelo de inestabilidad dinámica**. Este modelo supone la existencia de dos poblaciones de microtúbulos, una que crece en longitud mediante la continua polimerización en sus extremos *más* y otra que disminuye en longitud por depolimerización. La diferencia entre las dos poblaciones estriba en que los MTs en crecimiento presentan la tubulina unida a GTP en sus extremos *más*, mientras que los MTs que están disminuyendo en tamaño, presentan GDP. Debido a que las moléculas de tubulina unidas a GTP tienen mayor afinidad entre ellas que por la tubulina unida a GDP, la presencia de un grupo de moléculas de tubulina unidas a GTP en el extremo *más*, da lugar a la formación de un *casquete* de GTP, que proporciona un extremo estable en el microtúbulo, al que se pueden unir más dímeros (Figura 15.7a). Se piensa que la pérdida de GTP tiene como resultado la aparición de un extremo inestable, en el que la depolimerización puede tener lugar rápidamente.

La concentración de tubulina unida a GTP es crucial para el modelo de inestabilidad dinámica. Cuando hay disponibles muchas tubulinas unidas a GTP, éstas se añaden rápidamente al microtúbulo, formando un gran casquete de tubulina-GTP. Sin embargo, si la concentración de tubulina-GTP disminuye, la tasa de incorporación de tubulina decrece. Cuando la concentración de GTP-tubulina es suficientemente baja, la tasa de hidrólisis de GTP en las subunidades de tubulina β en las proximidades del extremo del MT, supera la tasa de incorporación de tubulina unida a GTP nueva. Esto tiene como resultado el acortamiento del casquete de GTP. Cuando el casquete de GTP desparece, el MT se vuelve inestable, y la pérdida de subunidades unidas a GDP se ve favorecida por su extremo.

La observación in vitro, con el microscopio óptico, de microtúbulos aislados, aporta evidencias directas de la inestabilidad dinámica. Un mismo MT puede alternar entre periodos de crecimiento y acortamiento (Figura 15.7b). Cuando un microtúbulo pasa de la elongación al acorta-



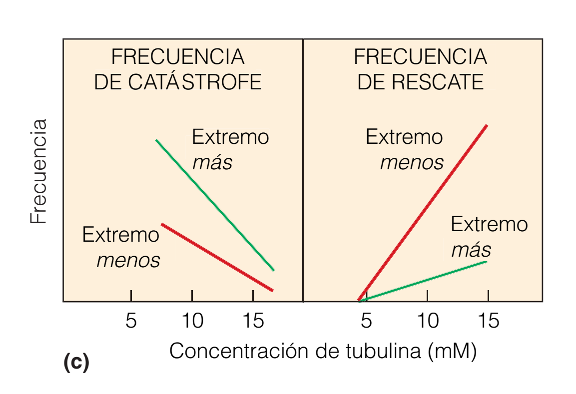


Figura 15.7 El casquete de GTP y su función en la inestabilidad dinámica de los microtúbulos. (**a**) Modelo que ilustra la función del casquete de GTP. Cuando la concentración de tubulina es alta, la rapidez con la que se incorpora GTP-tubulina al extremo del microtúbulo es mayor que con la que se hidroliza el GTP incorporado. El casquete de GTP resultante estabiliza el extremo del MT y promueve el crecimiento. La tasa de crecimiento a concentraciones menores de tubulina disminuye, aumentando la hidrólisis del GTP. Se forma así un extremo inestable (sin casquete de GTP) que favorece la depolimerización del MT. La existencia de la inestabilidad dinámica está apoyada por datos experimentales.(**b**) Las fases de crecimiento y acortamiento se alternan en un MT individual observado con microscopía óptica. Los extremos *más* y *menos* crecen y se encogen independientemente. (**c**) La frecuencia de la catástrofe y el rescate del microtúbulo dependen de la concentración de tubulina. La catástrofe, el cambio de crecimiento a acortamiento, es menos frecuente con concentraciones de tubulina elevada. El rescate, el paso de acortamiento a crecimiento, es más frecuente con concentraciones altas de tubulina.

miento, un fenómeno que se conoce como *catástrofe del microtúbulo*, éste puede desaparecer completamente, o puede volver repentinamente a la fase de crecimiento, un evento denominado *rescate del microtúbulo*. La frecuencia de la catástrofe está inversamente relacionada con la concentración de tubulina libre. Las concentraciones elevadas de tubulina hacen que la catástrofe sea más improbable, aunque puede ocurrir. Cuando tiene lugar la catástrofe, una concentración de tubulina alta hace más probable el rescate de un microtúbulo que está reduciéndose (Figura 15.7c). La catástrofe es más probable en el extremo *más* de un MT, independientemente de la concentración de tubulina, es decir, la inestabilidad dinámica es más patente en el extremo *más* del microtúbulo. Se ha demostrado la inestabilidad dinámica en células vivas utilizando microscopía de contraste interferencial-diferencial (DIC), mejorada por vídeo, para seguir los ciclos vitales de MTs aislados (Figura 15.8). Estos estudios han demostrado que el fenómeno de la inestabilidad dinámica no es exclusivo de los MTs in vitro.

Los microtúbulos se originan dentro de la célula en centros organizadores de microtúbulos

En los apartados anteriores hemos analizado principalmente las propiedades de la tubulina y los MTs in vitro, lo que nos ha proporcionado la base para entender cómo funcionan en la célula. Sin embargo, la formación de MTs in vivo es un proceso más ordenado y regulado, que produce grupos de MTs en lugares determinados de la célula para funciones celulares específicas.

Los microtúbulos normalmente se originan a partir de una estructura celular denominada **centro organizador microtubular (MTOC).** Un MTOC sirve como un lugar en el que se inicia el ensamblaje de los MTs, a la vez que proporciona un punto de anclaje para uno de los extremos de estos MTs. Muchas células durante la interfase tienen un MTOC llamado centrosoma que está situado cerca del núcleo. En las células animales, el centrosoma está compuesto normalmente por dos *centriolos* rodeados por un material granuloso difuso conocido como **material pericentriolar** (Figura 15.9a). En micrografías electrónicas del centrosoma, se puede observar que los MTs se forman a partir del material pericentriolar (Figura 15.9b). La estructura simétrica de los centriolos es extraordinaria (Figura 15.9a). En la mayor parte de los casos, los centriolos se orientan perpendicularmente uno con respecto al otro: la razón de esta colocación no se conoce aún. Se sabe que los centriolos están implicados en la formación de los corpúsculos basales, que son importantes para la formación de los cilios y los flagelos (*véase* Capítulo 16). El papel de los centriolos en las células no ciliadas es menos claro. En las células animales, los centriolos pueden servir para reclutar el material pericentriolar al centrosoma, que servirá posteriormente como núcleo para el crecimiento de los MTs.

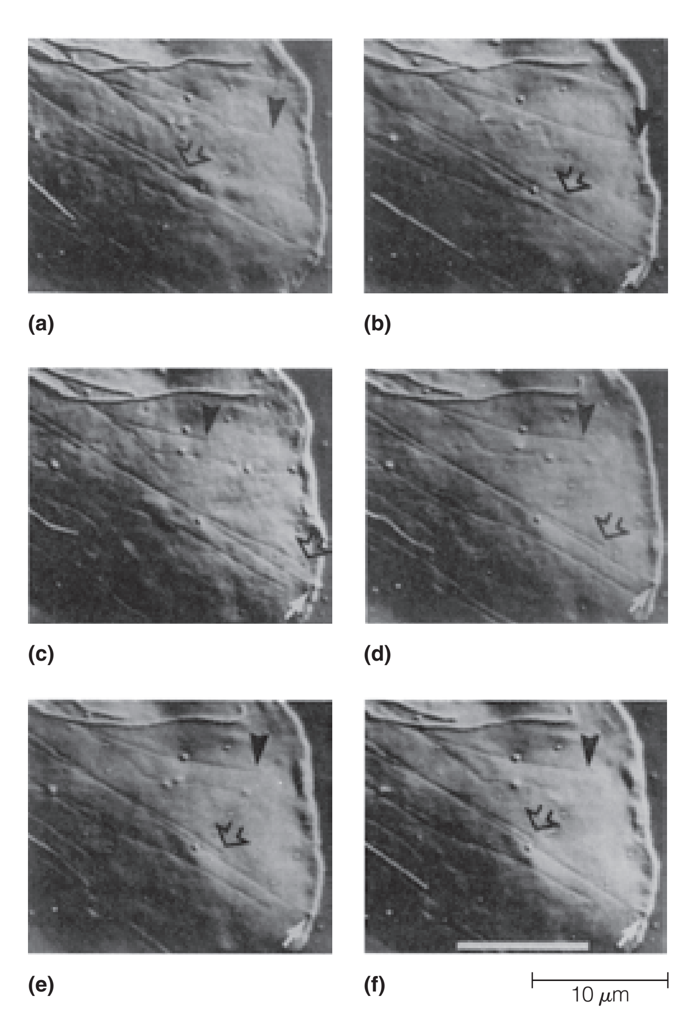
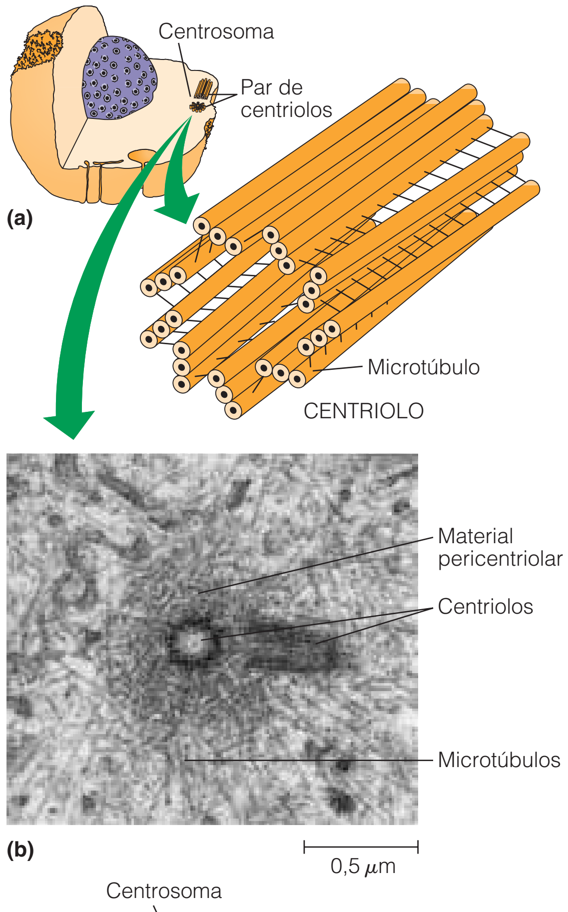


Figura 15.8 La inestabilidad dinámica de los microtúbulos in vivo. Los microtúbulos de una célula viva, observados por microscopía de contraste interferencial-diferencial (DIC), mejorada digitalmente, presentan inestabilidad dinámica in vivo. Los MTs, indicados aquí con varios tipos de flechas, se han registrado a lo largo del tiempo, desde (**a**) hasta (**f**). Los MTs crecen hasta el borde de la célula y después se acortan rápidamente. Para una explicación del microscopio DIC, consultar el Apéndice.

Cuando los centriolos no están presentes en las células animales, se dispersa el material que sirve como núcleo para el crecimiento de los MTs, y desaparece el MTOC. Las células que no poseen centriolos pueden dividirse, probablemente porque los cromosomas sean capaces de organizar a los MTs a partir de alguno de sus extremos. Sin embargo, los husos que se forman están poco organizados. A diferencia de las células animales, las células de los vegetales superiores no poseen centriolos; esto indica que los centriolos no son imprescindibles para la formación de MTOCs.

Los grandes complejos proteicos con forma de anillo, propios del centrosoma, contienen otro tipo de tubulina, la **tubulina γ**. Se pueden ver los anillos de tubulina γ en la base de los MTs que emergen del centrosoma (Figura 15.10). Los complejos con forma de anillo de tubulina γ sirven como núcleo para el ensamblaje de nuevos MTs



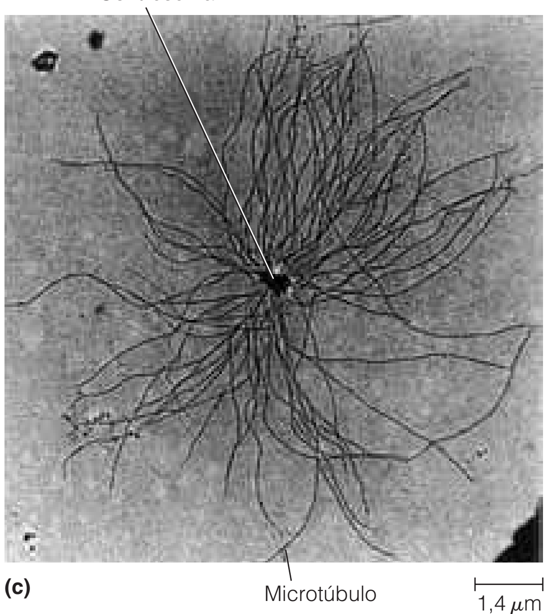


Figura 15.9 Centrosoma. (**a**) En las células animales, el centrosoma está formado por dos centriolos y un material pericentriolar asociado. Las paredes de los centriolos están compuestas por nueve tripletes de microtúbulos. (**b**) Micrografía electrónica del centrosoma, mostrando los centriolos y el material pericentriolar. Obsérvese que los microtúbulos se originan a partir del material pericentriolar. (**c**) Nucleación y ensamblaje de MTs en un centrosoma in vitro.

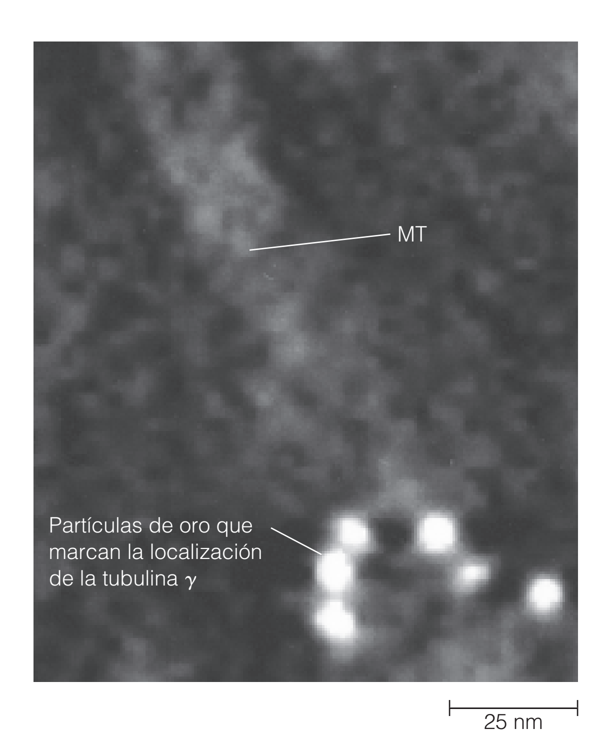


Figura 15.10 γ-tubulina en la base de los microtúbulos que se originan desde el centrosoma. Micrografía electrónica de un MT que se origina desde el centrosoma. La tubulina γ fue marcada aquí con anticuerpos unidos a pequeñas partículas de metal. En la micrografía electrónica, estos anticuerpos aparecen como esferas brillantes (TEM).

desde el centrosoma. En el centrosoma también se encuentran otras proteínas, como *la pericentrina.* Aparte del centrosoma, ciertos tipos celulares poseen otros MTOCs. Por ejemplo, los corpúsculos basales de la base de cada cilio en las células ciliadas funcionan también como un MTOC.

Los MTOCs organizan y polarizan los microtúbulos en la célula

El centrosoma u organizador microtubular, desempeña un papel importante en el control de la organización de los microtúbulos en la célula. El aspecto más importante de esta función, probablemente sea la capacidad del MTOC de nuclear y anclar los MTs. Gracias a esta capacidad, los MTs se extienden desde el MTOC hacia la periferia de la célula. Es más, crecen desde el MTOC con una polaridad determinada —sus extremos *menos* anclados en el MTOC, y sus extremos *más* extendiéndose hacia la membrana celular—. La relación entre el MTOC y la distribución y polaridad de los MTs se muestra en la Figura 15.11.

El MTOC también influye en el número de microtúbulos de una célula. Cada MTOC tiene un número limitado de sitios de nucleación y anclaje que determinan cuántos MTs pueden formar. No obstante, la capacidad de nucleación de MTs del MTOC puede modificarse durante ciertos procesos como la mitosis. Por ejemplo, la cantidad de peri-

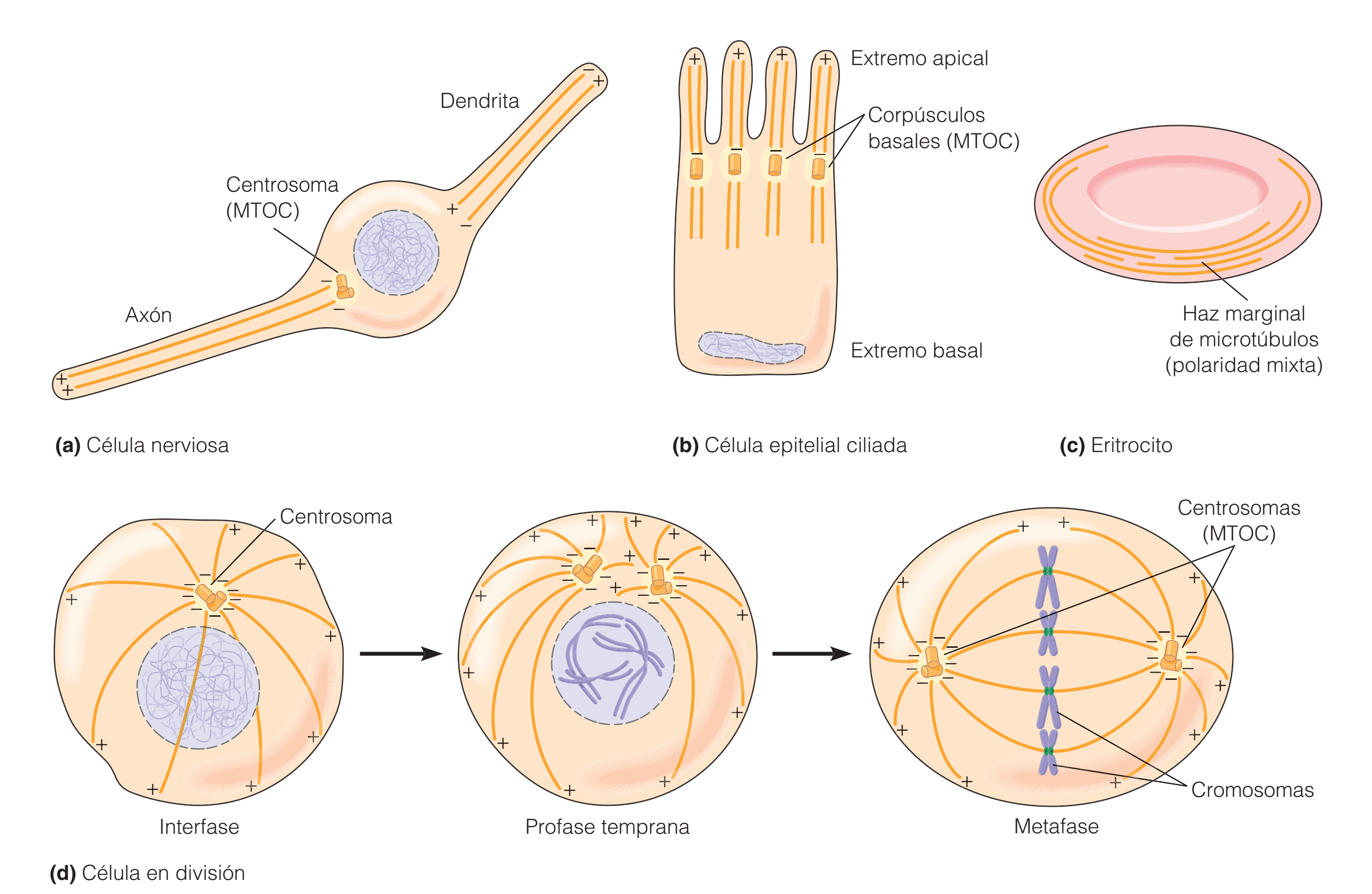


Figura 15.11 Efectos de la polaridad de los microtúbulos en su orientación dentro de las células animales. En la célula, la distribución de la mayoría de los microtúbulos, viene determinada por el centro organizador de microtúbulos (MTOC), que en muchas ocasiones es un centrosoma. La orientación de los MTs en una célula puede variar con la función de esa célula. Los microtúbulos se señalan en naranja. (**a**) Las células nerviosas poseen dos grupos de MTs, aquellos que se encuentran en el axón y aquellos que están en la dendrita. Los MTs axonales están unidos al centrosoma por su extremo *menos*, con sus extremos *más* en el extremo del axón. Por su parte, los MTs de la dendrita no están asociados con el centrosoma y tienen polaridades mixtas. (**b**) Las células epiteliales ciliadas tienen muchos MTOCs denominados corpúsculos basales, uno en la base de cada cilio. Los MTs ciliares se originan con su extremo *menos* en los corpúsculos basales y se alargan con su extremo *más* hacia el extremo del cilio. (**c**) Los eritrocitos humanos maduros no poseen ni núcleo ni MTOC. No obstante, tienen MTs, cuya polaridad es mixta y forman una banda circular en la periferia de la célula. Esta banda ayuda a mantener su forma discoidal (**d**) A lo largo del proceso de la mitosis, los MTs de una célula en división están orientados con sus extremos *menos* anclados en el centrosoma y sus extremos *más* apuntando lejos de él. La división celular está precedida por la división del centrosoma. Después los dos centrosomas se separan, y forman cada uno un polo del huso mitótico. En la metafase, los centrosomas se encuentran en lados opuestos de la célula. Cada centrosoma, o polo del huso, forma la mitad de los MTs del huso, algunos de los cuales se extienden desde el polo hasta los cromosomas, mientras que otros lo hacen desde un polo hasta el otro.

centrina fluctúa durante la mitosis, siendo más alta en la profase y la metafase, cuando los polos del huso muestran la mayor actividad nucleadora.

La estabilidad de los microtúbulos está estrechamente regulada en las células

La capacidad de nuclear de los MTOCs, como el centrosoma, tiene una consecuencia importante para la dinámica de los microtúbulos en las células. Debido a que los extremos *menos* de muchos MTs están anclados al centrosoma, el crecimiento y acortamiento dinámico de estos microtúbulos en sus extremos *más* tiende a suceder en la periferia de las células.

Ya hemos visto que los microtúbulos celulares presentan una inestabilidad dinámica; crecen desde el centrosoma y después se desensamblan. Este proceso puede ocurrir así en los MTs de vida corta, distribuidos al azar en la célula, pero no en los grupos organizados y estables. Los MTs son generalmente demasiado inestables para permanecer intactos durante mucho tiempo y se colapsan si no se estabilizan de alguna manera. Una forma de estabilizar los MTs es «capturar» y proteger sus extremos *más* en crecimiento.

Durante la mitosis se puede observar un buen ejemplo de cómo esta captura de los microtúbulos, produce un conjunto de MTs ordenados de una manera precisa (Figura 15.11d), como analizaremos en el Capítulo 19. Antes de la profase, el centrosoma se replica, dando lugar a dos

centrosomas hijos. Éstos se separan durante la profase temprana y se mueven a lados opuestos de la célula, donde sirven como los polos del huso mitótico. Cuando se desorganiza la membrana nuclear, los cromosomas se conectan con los polos por medio de los MTs. Para estabilizar estas conexiones, el cinetocoro de cada cromosoma captura los extremos *más* de los MTs. Aquellos MTs que a medida que crecen desde el polo del huso, encuentren un cinetocoro, serán capturados y estabilizados. Aquellos que no lo encuentren se desorganizarán finalmente, por inestabilidad dinámica, y serán reemplazados por unos nuevos que experimentarán el mismo proceso. A través de sucesivos ciclos de crecimiento y depolimerización de MTs, el cinetocoro de cada cromosoma capturará finalmente un MT y se conectará a los polos del huso acromático.

Los cinetocoros no son los únicos lugares donde se estabilizan los extremos *más* de los MTs. Los MTs asociados con el *córtex* celular, la red de actina desarrollada por debajo de la membrana plasmática, son estabilizados en algunas situaciones. Tanto en el cinetocoro como en el córtex, existen unas *proteínas «rastreadoras» de extremos más* que se asocian con dichos extremos de los MTs. Se cree que estas proteínas, ya sea directa o indirectamente, estabilizan los extremos *más* y disminuyen la probabilidad de que sufran una pérdida catastrófica de subunidades.

Ciertas drogas afectan al ensamblaje de los microtúbulos

Existen varias drogas que afectan el ensamblaje de los microtúbulos. La más conocida es la **colchicina**, presentada anteriormente en este capítulo, que actúa uniéndose a los dímeros de tubulina. El complejo cochicina-tubulina resultante, puede unirse al extremo en crecimiento del MT, pero bloquea la incorporación posterior de moléculas de tubulina y desestabiliza la estructura, promoviendo por lo tanto la depolimerización del MT. La *vinblastina* y la *vincristina* son compuestos relacionados que se obtienen de la vinca menor (*Vinca minor*), que provocan la agregación de la tubulina en el interior de la célula. El nocodazol (un benzimidazol sintético) es otro compuesto que inhibe la polimerización de los MTs y se usa frecuentemente en algunos experimentos en lugar de la colchicina, porque sus efectos se pueden revertir con mayor facilidad cuando se retira la droga.

Estos compuestos se conocen como *drogas antimitóticas* porque desorganizan el huso mitótico de las células en división, bloqueando el progreso de la mitosis. La sensibilidad del huso mitótico a estas drogas es comprensible ya que las fibras del huso están compuestas por muchos microtúbulos. La vinblastina y la vincristina tienen también aplicación médica como drogas anticancerosas. Se utilizan con este propósito porque las células cancerosas se dividen rápidamente y son, por lo tanto, más susceptibles a las drogas que interfieren con el huso mitótico.

El *taxol*, que también ha sido presentado anteriormente en este capítulo, tiene el efecto contrario en los microtúbulos: cuando se une a los MTs, los estabiliza. Dentro de las células, provoca que la tubulina libre se una, formando MTs y secuestrando a las células en mitosis. Así, tanto el taxol como la colchicina bloquean a las células en la mitosis, pero lo hacen produciendo efectos opuestos en los MTs, y por tanto, en las fibras del huso mitótico. El taxol se usa también en el tratamiento de algunos tipos de cáncer, en especial en el de cáncer de mama.

Los microtúbulos están regulados en toda su longitud por proteínas asociadas a microtúbulos

Se sabe que ciertas proteínas modulan la estructura, el ensamblaje y la función de los microtúbulos. Estas proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs) representan el 10-15% de la masa de MTs aislados de las células. Las MAPs confieren un nivel de regulación extra a la organización y funciones de los MTs. Para modular la función de los MTs, muchas MAPs se unen a ellos a intervalos regulares, formando proyecciones desde la pared, que permiten la interacción con otros filamentos y estructuras celulares. Las MAPs son también importantes en la regulación del ensamblaje de los MTs, probablemente uniéndose al extremo *más* en crecimiento de un microtúbulo y estabilizándolo y previniendo así su desensamblaje. Se ha demostrado que la mayoría de las MAPs aumentan la estabilidad de los MTs, y algunas pueden incluso estimular su ensamblaje. Las diferentes MAPs difieren principalmente en la forma en la que unen MTs entre sí o con otras estructuras, y en cómo se regulan sus efectos en los MTs.

La función de las MAPs ha sido muy estudiada en las células cerebrales, ya que constituyen la fuente principal de estas proteínas. Se pueden distinguir dos clases de MAPs asociadas a los MTs de las células cerebrales: las proteínas motoras asociadas a los MT (MAPs motoras) y las MAPs no motoras. Las **MAPs motoras** se denominan así porque usan ATP para dirigir el transporte de vesículas u orgánulos o para generar fuerzas de deslizamiento entre MTs. Entre ellas se encuentran la quinesina y la dineína. Estudiaremos estas proteínas más detalladamente en el Capítulo 16.

Las **MAPs no motoras** parecen controlar la organización de los microtúbulos en el citoplasma. Un ejemplo llamativo de dicha función puede observarse en las neuronas. El correcto funcionamiento del sistema nervioso depende de las conexiones que establecen las neuronas entre sí, y con otros tipos celulares. Para ello, las neuronas emiten prolongaciones llamadas *neuritas*, que se encuentran reforzadas por haces de MTs. Las neuritas al final se diferencian en axones, que transportan señales eléctricas desde el cuerpo celular de la neurona, y en dendritas, que reciben señales de las células vecinas y las transportan al cuerpo celular. Los haces de MTs son particularmente más densos en los axones que en las dendritas.

La razón de estas diferencias radica en que las dendritas y los axones contienen diferentes MAPs. Por ejemplo, una MAP específica de axones llamada *Tau* hace que los MTs formen haces tensos. Una familia de MAPs denominada MAP2 está presente en las dendritas y provoca que los haces de MTs sean más laxos.

Se puede demostrar la importancia de las MAPs en el proceso de formación de neuritas introduciendo la proteína Tau en una línea celular no neuronal que normalmente no puede fabricar ninguna de estas proteínas. Estas células son redondas en condiciones normales, pero cuando se introduce el gen de *tau* y se expresa, estas células extienden prolongaciones largas, notablemente similares a los axones.

La diversidad de las MAPs puede ayudar a explicar cómo pueden diferir las células en la organización de sus microtúbulos. Además, la función de algunas MAPs puede alterarse mediante fosforilación, lo que proporciona a la célula un medio rápido de control de la organización de los microtúbulos.

Microfilamentos

Con un diámetro cercano a los 7 nm, los **microfilamentos (MFs)** son los filamentos más pequeños del citoesqueleto (*véase* Tabla 15.1). El aspecto mejor conocido de los microfilamentos es la función que desempeñan en las fibras contráctiles de las células musculares, donde interaccionan con filamentos de miosina, más gruesos, para provocar las contracción característica del músculo. Sin embargo, los MFs no son exclusivos de las células musculares; están presentes en casi todas las células eucariotas y participan en muchos otros fenómenos, que incluyen varias funciones locomotoras y estructurales.

Algunos ejemplos de los movimientos celulares en los que participan los microfilamentos son el *movimiento ameboide*, movimiento de las células sobre un sustrato al que están unidas, y las *corrientes citoplásmicas*, un patrón de flujo citoplásmico regular de algunas células vegetales y animales. Los MFs también producen los surcos de segmentación que dividen el citoplasma de las células animales durante la citocinesis. Trataremos con más detalle todos estos fenómenos en el Capítulo 16. Los MFs también están presentes en los lugares de unión de una célula con otra y con la matriz extracelular (*véase* Capítulo 17).

Además de mediar algunos tipos de movimientos celulares, los MFs también son importantes en el desarrollo y mantenimiento de la forma celular. Por ejemplo, casi todas las células animales poseen una intrincada red de microfilamentos justo debajo de la membrana plasmática que se denomina *córtex celular*. El córtex aporta rigidez estructural en la superficie de la célula y facilita los cambios de forma y el movimiento celular. Por otra parte, el núcleo estructural de las microvellosidades, las extensiones en forma de dedo que se encuentran en la superficie de muchas células animales, está formado por haces paralelos de MFs (*véase* Figura 4.2).

La actina es la proteína con la que se construyen los microfilamentos

La actina es una proteína extremadamente abundante en prácticamente todas las células eucariotas, incluyendo las células de las plantas, las algas y los hongos. La actina se sintetiza como un único polipéptido de 375 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 42 kDa. Una vez sintetizada, se pliega tomando una forma similar a una U, con una cavidad central que une ATP o ADP (Figura 15.12). Las moléculas individuales de actina se denominan actina-G (actina globular). Bajo las condiciones apropiadas, las moléculas de actina-G polimerizan para formar microfilamentos; esta forma, se conoce como actina-F (actina filamentosa). La actina, tanto en su forma G como F, se une a muchas otras proteínas. Estas *proteínas de unión a actina* bien regulan y modifican la función de la actina, bien son reguladas u organizadas ellas mismas por la asociación con la actina.



Figura 15.12 Estructura molecular de un monómero de G-actina. La cristalografía de rayos X muestra que el monómero de actina-G tiene una conformación similar a una U. Un nucleótido (ATP o ADP) se une reversiblemente en una cavidad de la proteína. Cuando los monómeros de actina-G polimerizan formando F-actina, la entrada de la cavidad se tapa por otro monómero de G-actina, atrapando en el interior el nucleótido unido. Además, la unión de una actina-G a otra, provoca que la entrada a la cavidad se cierre más fuertemente sobre el nucleótido unido, promoviendo la hidrólisis del ATP.

En las células existen diferentes tipos de actinas y de proteínas relacionadas con la actina

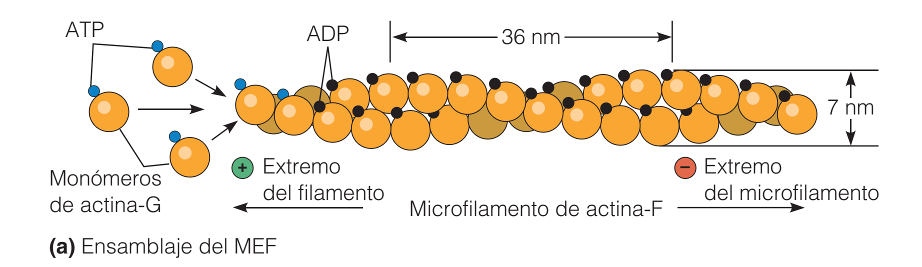
La actina es la más conservada de los tres tipos de proteínas del citoesqueleto. En ensayos funcionales, todas las actinas parecen idénticas y las de diferentes organismos pueden copolimerizar en filamentos. A pesar de este alto grado de similitud en la secuencia, las actinas son diferentes entre diferentes organismos y entre distintos tejidos de un mismo organismo. Basándonos en la similitud en la secuencia, podemos distinguir dos grandes grupos principales: las actinas específicas del músculo (actinas α) y las actinas no musculares (actinas β y γ). En el caso de las actinas β y γ, se ha demostrado recientemente que se localizan en diferentes regiones de la célula y que parece que interaccionan de manera diferente con las proteínas de unión a actina. Por ejemplo, en las células epiteliales, que presentan una región apical, dotada de microvellosidades, y otra basal, unida a la matriz extracelular (*véase* Figura 17.17), la actina β se encuentra predominantemente en el extremo apical, mientras que la actina γ se concentra en el extremo basal y en los lados de la célula.

Además de los diferentes tipos de actinas, existe una colección de proteínas parecidas, que se denominan *proteínas relacionadas con la actina (Arps)*. El grado de semejanza con las actinas es menor y así, por ejemplo, las actinas de las levaduras y del pollo son idénticas en más del 90% de sus aminoácidos, mientras que las Arps presentan sólo el 50% de similitud con varias actinas diferentes. Como veremos más tarde en este capítulo, Arp2 y Arp3 participan en la nucleación de nuevos microfilamentos en las células en migración.

Los monómeros de actina-G polimerizan en microfilamentos de actina-F

De manera parecida a los dímeros de tubulina, los monómeros de actina-G pueden polimerizar reversiblemente en filamentos, con una fase de iniciación lenta que corresponde a la nucleación del filamento, seguida por una fase más rápida de crecimiento del polímero. La cinética de la polimerización de la actina puede estudiarse en una disolución, utilizando actina-G fluorescente. Se puede medir la fluorescencia de la actina-F marcada, para obtener datos muy similares a los de la tubulina. Los filamentos de actina-F que se forman, están compuestos por dos hebras lineales de actina-G polimerizada, unidas una a la otra formando una hélice, con más o menos 13,5 monómeros de actina por vuelta (Figura 15.13).

Todos los monómeros de actina están orientados en la misma dirección dentro de un mismo microfilamento, por lo que el MF, al igual que el microtúbulo, posee una polaridad inherente, con un extremo que difiere del otro tanto química como estructuralmente. Dicha polaridad puede ser fácilmente demostrada incubando a MFs con el **subfragmento 1de la miosina** (S1), un fragmento proteolítico de la miosina (Figura 15.14). Los fragmentos S1 se unen, o «decoran», a los MFs de actina siguiendo un patrón en forma de flecha, con todas las moléculas de S1 apuntando en la misma dirección (Figura 15.14c). Basándose en este patrón en forma de flecha, frecuentemente se utilizan los términos extremo puntiagudo y extremo barbado, para identificar los extremos *menos* y *más*, respectivamente, de un MF. La polaridad en el MF es importante porque permite una regulación independiente de la poli-



(a) Ensamblaje del MEF

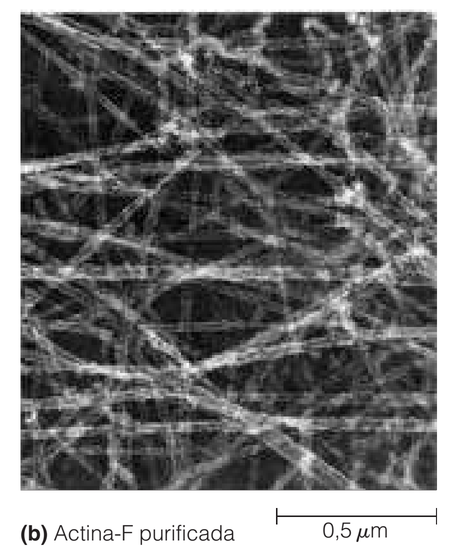

(b) Actina-F purificada
0,5 μm

Figura 15.13 **Modelo del ensamblaje de los microfilamentos in vitro.** (**a**) Los monómeros de actina-G polimerizan en filamentos largos de actina-F con un diámetro aproximado de 7 nm. La hélice da una vuelta cada 36-37 nm, y se requieren cerca de 13,5 monómeros para una vuelta completa. La incorporación de cada monómero de actina-G está acompañada o seguida de la hidrólisis de la molécula de ATP, que lleva fuertemente unida el monómero. De todas formas, no se requiere la energía de hidrólisis del ATP para llevar a cabo la reacción de polimerización. (**b**) Micrografía electrónica de actina-F purificada (TEM).

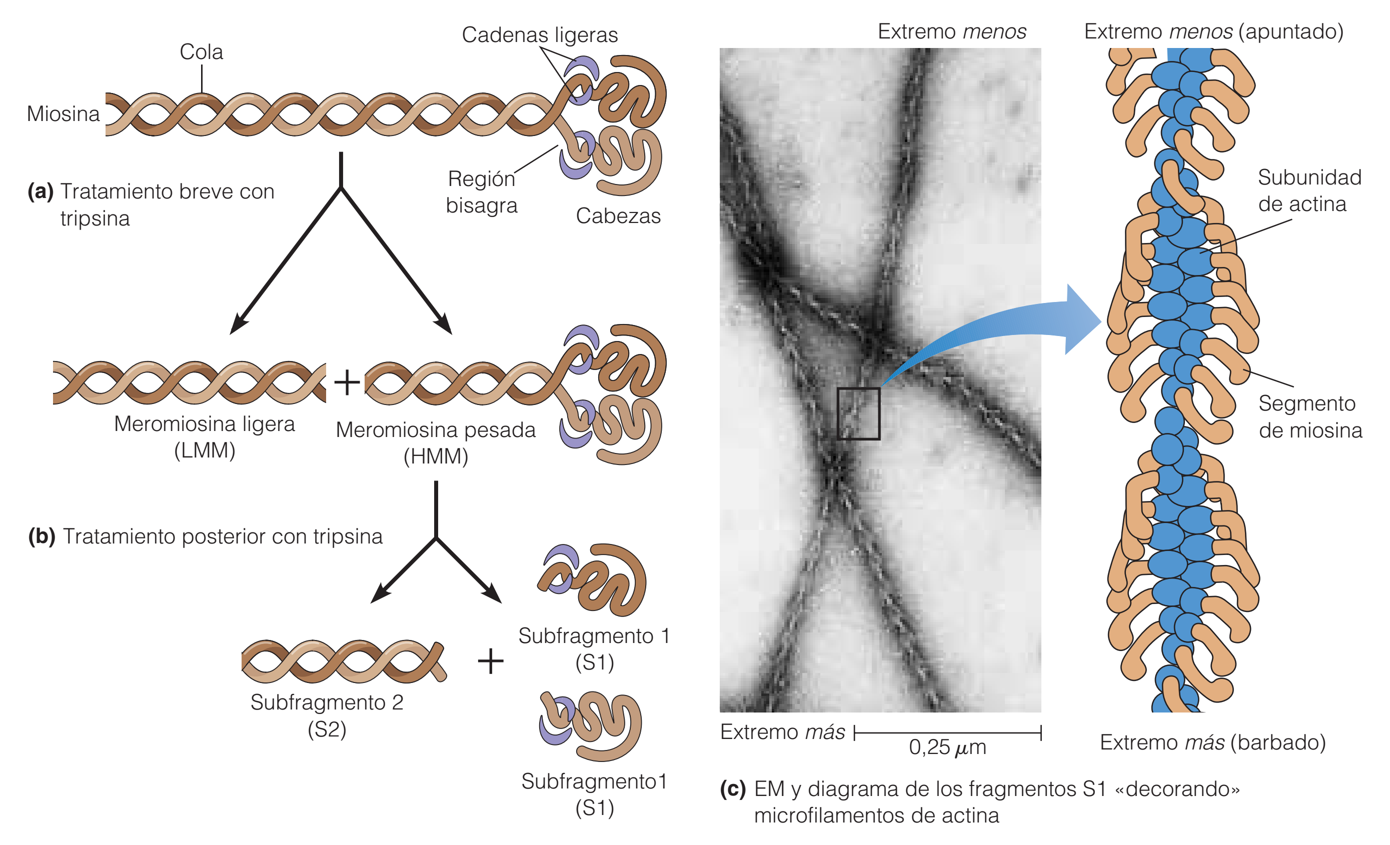


Figura 15.14 Utilización de subfragmentos de miosina S1 para determinar la polaridad de la actina. La miosina II forma parte de la maquinaria contráctil de las células musculares. La cabeza globular de la molécula de miosina se une a la actina, mientras que las colas de miosina pueden asociarse con filamentos de miosina (los miofilamentos gruesos de las células musculares). **(a)** La miosina II puede ser escindida por acción de proteasas, como la tripsina, en dos partes, la meromiosina pesada (HMM) y la meromiosina ligera (LMM). **(b)** La HMM puede digerirse posteriormente, quedando sólo la cabeza globular. Este fragmento, denominado, subfragmento 1 de la miosina (S1), conserva sus propiedades de unión a actina. **(c)** Cuando se incuban los microfilamentos de actina con la miosina S1 y se examina después con un microscopio electrónico, los fragmentos S1 parecen «decorar» los microfilamentos como puntas de flecha. Todas las puntas de flecha S1 señalan el extremo *menos*, indicando la polaridad del MF.

merización y depolimerización de la actina, en cada extremo del filamento.

La polaridad de los microfilamentos se refleja en la incorporación o pérdida de actina-G, más rápida en el extremo *más*, y la incorporación o pérdida de actina-G, más lenta en el extremo *menos* (Figura 15.13a). Si se añade actina-G a pequeños fragmentos de actina-F decorada con S1, la polimerización sucederá mucho más rápida en el extremo barbado, lo que indica que este extremo del filamento coincide con el extremo *más*. Aunque las condiciones sean favorables para la incorporación de monómeros en ambos extremos del filamento, el extremo *más* crecerá más rápido que el extremo *menos*.

A medida que los monómeros de actina-G se ensamblan al microfilamento, el ATP que llevan unido se hidroliza lentamente a ADP, de la misma manera que el GTP unido a la tubulina se hidrolizaba a GDP. Así, los extremos en crecimiento de un MF tienden a tener ATP-actina-F, mientras que la mayor parte del MF está compuesto por ADP-actina-F. No obstante, la hidrólisis del ATP no es un requisito indispensable para la elongación del MF, ya que los MF pueden también elongarse con ADP-actina-G o a partir de análogos no hidrolizables de ATP-actina-G.

Las células pueden regular dinámicamente la manera y el lugar donde se ensambla la actina

Como acabamos de ver, al igual que ocurre con los microtúbulos, las células pueden regular dinámicamente dónde y cómo debe ensamblarse la actina-G, para formar los microfilamentos. Las células que se desplazan por un sustrato, tienen estructuras especializadas en su extremo de avance, denominadas *lamelipodios* y *filopodios*, que les permiten caminar sobre la superficie (trataremos con más detalle estas estructuras especializadas en el Capítulo 16). El tipo de protrusión parece depender de la naturaleza del movimiento celular y de la organización de los filamentos de actina en la célula. En aquellas células que están fuertemente adheridas al sustrato y que no se mueven bien, existen unos haces de actina, denominados *fibras de estrés* o de *refuerzo* , que se extienden desde la cola de la célula, o estela hasta el frente (Figura 15.15a). Las células que se mueven

Figura 15.15 Arquitectura de la actina en las células que se arrastran. La actina está presente en diferentes estructuras en células reptantes, como este macrófago. (**a**) Las fibras de estrés, haces contráctiles de actina, recorren la célula desde el lado de la cola hasta el frente de avance. (**b**) En la periferia de la célula se encuentra el córtex, que está constituido por una malla de filamentos de actina entrecruzados formando un gel. (**c**) El extenso lado de avance de los lamelipodios puede producir proyecciones delgadas, con forma de dedo, llamadas filopodios. Mientras que la mayor parte de los lamelipodios tienen una malla de actina, los filopodios presentan haces paralelos de filamentos de actina.

rápidamente no poseen estos haces de actina tan peculiares. En estas células, el córtex celular, que subyace inmediatamente bajo la membrana plasmática y que presenta mucha actina, está entrecruzado formando un gel o un entramado laxo de microfilamentos (Figura 15.15b). En el extremo de avance, y principalmente en los filopodios, los microfilamentos forman cables polarizados y altamente orientados, con su extremo barbado (*más*) orientado hacia la punta de la protrusión (Figura 15.15c). La actina de los lamelipodios está peor organizada que la de los filopodios (Figura 15.16). La comprensión de cómo las células regulan tal variedad de estructuras basadas en actina, requiere entender cómo las células pueden regular la polimerización de los MFs y cómo los MFs, una vez ya polimerizados, establecen redes.

Ciertas proteínas y drogas específicas afectan a la dinámica del polímero en los extremos de los microfilamentos

Las células controlan el proceso de polimerización del MF en varios puntos, incluyendo la nucleación de nuevos MFs y la elongación de los MFs ya existentes; también controlan la tasa de depolimerización de actina. Tanto las proteínas como los lípidos de membrana regulan la formación, estabilidad y la ruptura de los MFs. Aquí participan varias proteínas de unión a actina, fosfolípidos de inositol, que se encuentran en la cara interna de la membrana plasmática, y RAc, Rho y Cdc42, que son proteínas reguladoras pequeñas que ligan GTP (proteínas G monoméricas).

En ausencia de otros factores, el crecimiento de los microfilamentos depende de la concentración de actina-G

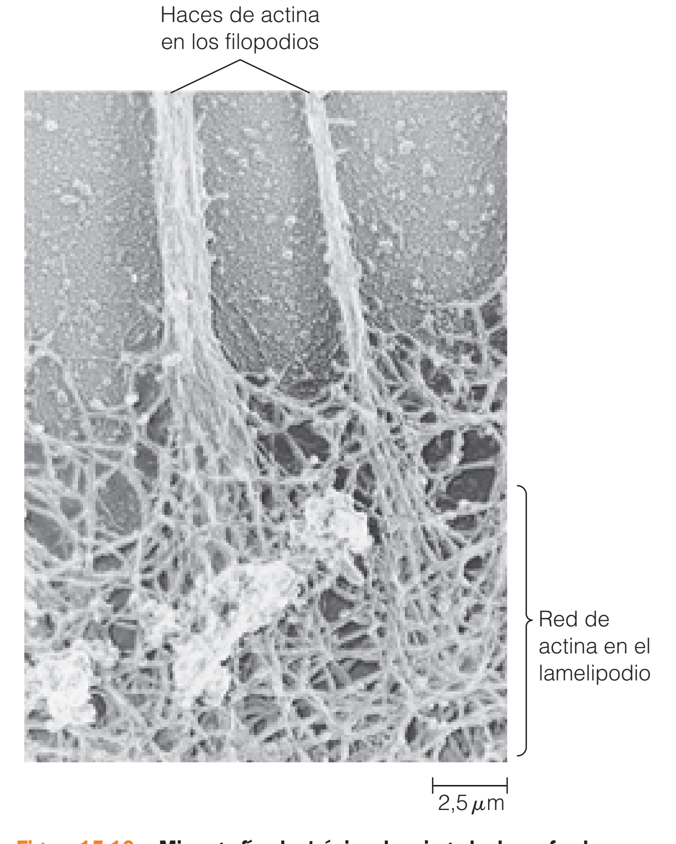


Figura 15.16 Micrografía electrónica de criograbado profundo mostrando los haces de actina en los filopodios. Esta vista de la periferia de un macrófago muestra dos grandes haces de actina dentro de los filopodios que se extienden desde la superficie celular. Los filamentos de actina en los filopodios se fusionan con una red de filamentos de actina que yacen justo debajo de la membrana plasmática del lamelipodio.

unida a ATP. Si es elevada, se formarán microfilamentos hasta que la concentración de actina-G unida a ATP sea limitante. Sin embargo, en la célula no se dispone de una gran cantidad de actina-G libre para la formación de microfilamentos, porque la mayoría está unida a la proteína *timosina β4*. En la transferencia de monómeros de actina-G desde el complejo *timosina β4* al extremo de un microfilamento en crecimiento, parece estar implicada una segunda proteína llamada *profilina*, pero esto sólo sucede si existen filamentos con extremos libres disponibles. Se sabe que otra proteína, conocida como *ADF/cofilina*, es capaz de unirse a ADP-G-actina y a F-actina; se cree que la *ADF/cofilina* incrementa la tasa de recambio de la ADP-actina-G en los extremos *menos* de los MFs. Esto hace que la ADP-actina-G liberada, esté disponible para ser convertida en ATP-actina-G, que puede ser reutilizada y añadirse a los extremos *más* en crecimiento de los MFs.

Las drogas que provocan la depolimerización de los microfilamentos afectan a la capacidad de la célula para incorporar actina-G en los extremos *más* de los MFs. Las **citocalasinas**, presentadas anteriormente, bloquean la incorporación de nuevos monómeros a los MFs polimerizados existentes. Como las subunidades se pierden gradualmente por los extremos *menos*, al final provocan una depolimerización. Por el contrario, la **latrunculina A** actúa secuestrando los monómeros de actina, impidiendo su incorporación en los extremos *más* de los MFs en crecimiento. En ambos casos, el resultado neto es la pérdida de los MFs en las células tratadas.

El crecimiento depende además de que los microfilamentos estén o no encasquetados. El encasquetamiento tiene lugar cuando una **proteína casquete** se une al extemo del filamento e impide la incorporación o pérdida adicional de subunidades, provocando así su estabilización. Una de estas proteínas que actúa como una capucha en los extremos *más* de los microfilamentos se denomina *CapZ*. Cuando Capz se une al extremo del filamento se bloquea la incorporación adicional de subunidades en el extremo *más*; cuando CapZ se quita, puede reanudarse la incorporación de subunidades.

Los fosfolípidos de inositol regulan a las moléculas que afectan a la polimerización de la actina

Los fosfolípidos de inositol son uno de los fosfolípidos de membrana. Un derivado del inositol, el inositol trifosfato (IP_3), es un componente clave en la vía de señalización a través de proteínas G heterotriméricas, como veremos en el Capítulo 14. Los grupos hidroxilo del anillo inositol del fosfatidil inositol, otro derivado del inositol, pueden ser fosforilados en el citoplasma por quinasas específicas, produciéndose varios productos fosforilados conocidos como *polifosfoinosítidos*. Algunos polifosfoinosítidos se unen a proteínas de unión a actina. Por ejemplo, *el fosfatidil inositol (4,5) bifosfato* (una de las formas del PIP_2), puede unirse a la profilina y a CapZ, y se cree que regula la capacidad de estas proteínas de interaccionar con la actina. CapZ se une fuertemente a PIP_2, lo que tiene como resultado su eliminación del extremo del microfilamento, permitiendo de esta manera, tanto la depolimerización del filamento, como el incremento de monómeros disponibles para la formación de nuevos filamentos.

La ramificación de la actina está controlada por el complejo Arp2/3

Además de los filamentos individuales de actina que se alargan o encogen, existen otras redes de actina en las células. Por ejemplo, los lamelipodios contienen filamentos de actina que constituyen una red en forma *dendrítica* o de árbol (Figura 15.17a). Ya hemos comentado anteriormente que los extremos barbados de las ramas rectas formadas por la polimerización de monómeros de actina por medio de la profilina, se encuentran probablemente bloqueados por proteínas casquete. En el lamelipodio intervienen además proteínas adicionales. El complejo **complejo Arp2/3**, constituido por proteínas relacionadas con la actina, participa en la ramificación mediante la nucleación de varias ramas en los lados de filamentos ya existentes, fenómeno demostrable cuando se añade actina-G fluorescente (por ejemplo, monómeros marcados con un colorante rojo fluorescente) a microfilamentos formados por actina marcada con una señal fluorescente diferente (por ejemplo, un colorante verde). Se observa que brotan ramas rojas de los microfilamentos verdes existentes cuando se añaden complejos Arp 2/3 activados (Figura 15.17b). Si se examinan las ramas utilizando anticuerpos que detectan Arp2/3, se observa que los complejos Arp2/3 se encuentran en los puntos de ramificación (Figura 15.17c). Los miembros de una familia de proteínas, que incluye a la *proteína del síndrome de Aldrich o WASP*, activan la ramificación a través de Arp2/3. Los enfermos que no pueden producir WASP funcional, tienen un déficit en la capacidad de sus plaquetas de cambiar de forma, y como consecuencia tienen problemas de coagulación sanguínea.

La polimerización de actina puede regularse independientemente del complejo Arp2/3, a través de proteínas conocidas como *forminas*. Las forminas son necesarias para ensamblar ciertas estructuras de F-actina, como los haces compactos y el anillo contráctil de la división celular (*véase* Capítulo 19).

Rho, Rac y Cdc-42 regulan la polimerización de la actina

La células en migración deben regular cuándo y dónde forman expansiones, organizando redes de actina en dichos lugares y desorganizándolas cuando ya no se necesiten más. Un caso llamativo de dicha regulación es el cambio dramático que experimenta el citoesqueleto en células expuestas a determinados factores de crecimiento. Por ejemplo, los fibroblastos crecen, se dividen y forman extensiones membranosas ricas en actina, similares a los

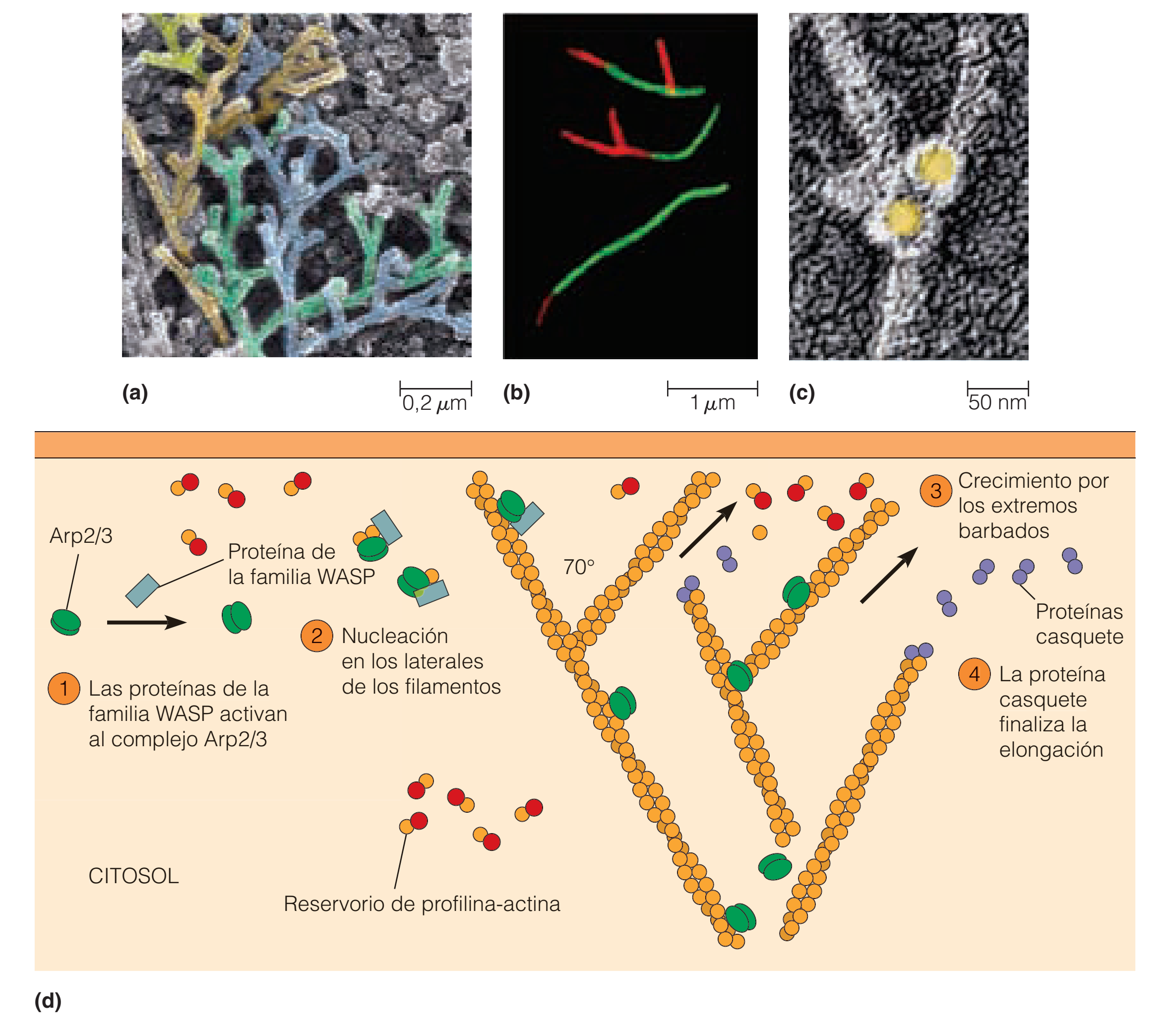


Figura 15.17 El complejo Arp2/3 y las redes ramificadas de actina. Las redes de actina, como las que se encuentran en las células en migración, presentan un patrón de ramificación característico. (**a**) Filamentos de actina ramificados en un queratocito de una rana. Los filamentos de actina ramificados están coloreados para facilitar su identificación (TEM de criograbado profundo). (**b**) La actina polimeriza formando ramas cuando se añaden monómeros de actina marcados fluorescentemente (rojo), y proteínas WASP y Arp2/3, a filamentos de actina preexistentes marcados con fluorescencia (verdes). Algunas ramas forman filamentos nuevos de actina (medio), mientras que otras ramas se forman en los laterales de filamentos de actina preexistentes (parte superior) (microscopía de fluorescencia). (**c**) La proteína Arp2/3 (detectada mediante el uso de anticuerpos conjugados con partículas de oro, en amarillo), se localizan en los puntos de ramificación (TEM criograbado profundo). (**d**) Modelo de ramificación dependiente de Arp2/3. Las proteínas de la familia WASP estimulan la ramificación; las proteínas casquete participan en la regulación de la longitud de las nuevas ramas.

lamelipodios, cuando son estimulados por el *factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)*. Otros factores, como el ácido lisofosfatídico (LPA) inducen a las células a formar fibras de estrés.

¿Cómo provocan dichas señales tal espectacular reorganización en el citoesqueleto de actina? Muchas de estas señales producen cambios en el citoesqueleto de actina a través de su acción sobre un pequeño grupo de proteínas relacionadas con la proteína G monomérica Ras, que está implicada en la transducción de señales mediadas por receptor (*véase* Capítulo 14). Las pequeñas proteínas G **Rac**, **Rho** y **Cdc42** son importantes reguladores de la polimerización de actina, dentro de las células. De hecho, estas proteínas son imprescindibles para que los factores de crecimiento, como el PDGF y el LPA, ejerzan sus efectos. Cada una de estas proteínas provoca efectos profundos y diferentes en el citoesqueleto de actina (Figura 15.18).

Por ejemplo, la estimulación de la vía de Rac tiene como resultado la extensión de lamelipodios y la inhibición de Rac impide esta respuesta normal al PDGF. De una manera similar, la activación de la vía de Rho tiene como resultado la formación de fibras de refuerzo, y la inactivación de Rho impide la aparición de estas fibras, después de la exposición de los fibroblastos a LPA. Por último, la activación de Cdc42 produce la formación de filopodios. Estos resultados indican que las proteínas G pequeñas regulan la formación de diferentes tipos de protrusiones. Lo llevan a cabo regulando la polimerización local de microfilamentos, que se ensam-

Los microorganismos infecciosos pueden moverse dentro de las células usando «colas» de actina

Uno de los hallazgos más notables en la investigación de la movilidad celular, es el descubrimiento de que ciertos microorganismos que causan las enfermedades, pueden aprovecharse de los sistemas de adhesión y movilidad de una célula para sortear sus defensas e introducirse en ellas (*véase* Capítulo 17). El ejemplo más estudiado es el de la bacteria gram-positiva *Listeria monocytogenes.* Una de las formas de adhesión *Listeria* es mediante la proteína *internalina* A, que se une a la *cadherina E*, proteína de la superficie de la célula huésped. (Para saber más sobre las cadherinas, *véase* el Capítulo 17.) Una vez unida, *Listeria* se introduce en la célula, se mueve por ella a una velocidad de 11 μm/min y avanza hacia las células vecinas sin infectar, donde continuará su ciclo infectivo (Figura 15.A1a). Desde la bacteria irradian pequeños filamentos de actina, formando «colas de cometa» de actina-F ramificada (Figura 15.A1b). Se ha descubierto, utilizando actina marcada fluorescentemente, que las colas se forman por la polimerización de actina dependiente de Arp2/3, que comienza a nuclear cerca de la superficie de la bacteria internalizada. La proteína de la superficie de *Listeria*, que promueve la polimerización de actina, se conoce como *ActA*. Dado que los microfilamentos nucleados por ActA son extremadamente similares a aquellos que se encuentran en el extremo de avance de las células en migración, probablemente las colas se formen utilizando gran parte de la propia maquinaria celular.

Otras bacterias inducen la formación de otros tipos diferentes de «colas» de actina. Las bacterias del género *Rickettsia*, que provocan el tifus, inducen la formación de largas colas de actina sin ramificar que recuerdan a los filopodios. Así, diferentes patógenos han desarrollado formas distintas de valerse del citoesqueleto del huésped para propulsarse.

Otros patógenos se unen a la superficie celular, pero no se internalizan. Por ejemplo, la forma enteropatógena de *E.coli*, que forma colonias en la superficie de las células epiteliales intestinales y provoca la diarrea en niños, se une al exterior de las células intestinales donde forma «pedestales» ricos en actina, que funcionan de manera similar a las colas de actina inducidas por *Listeria.*

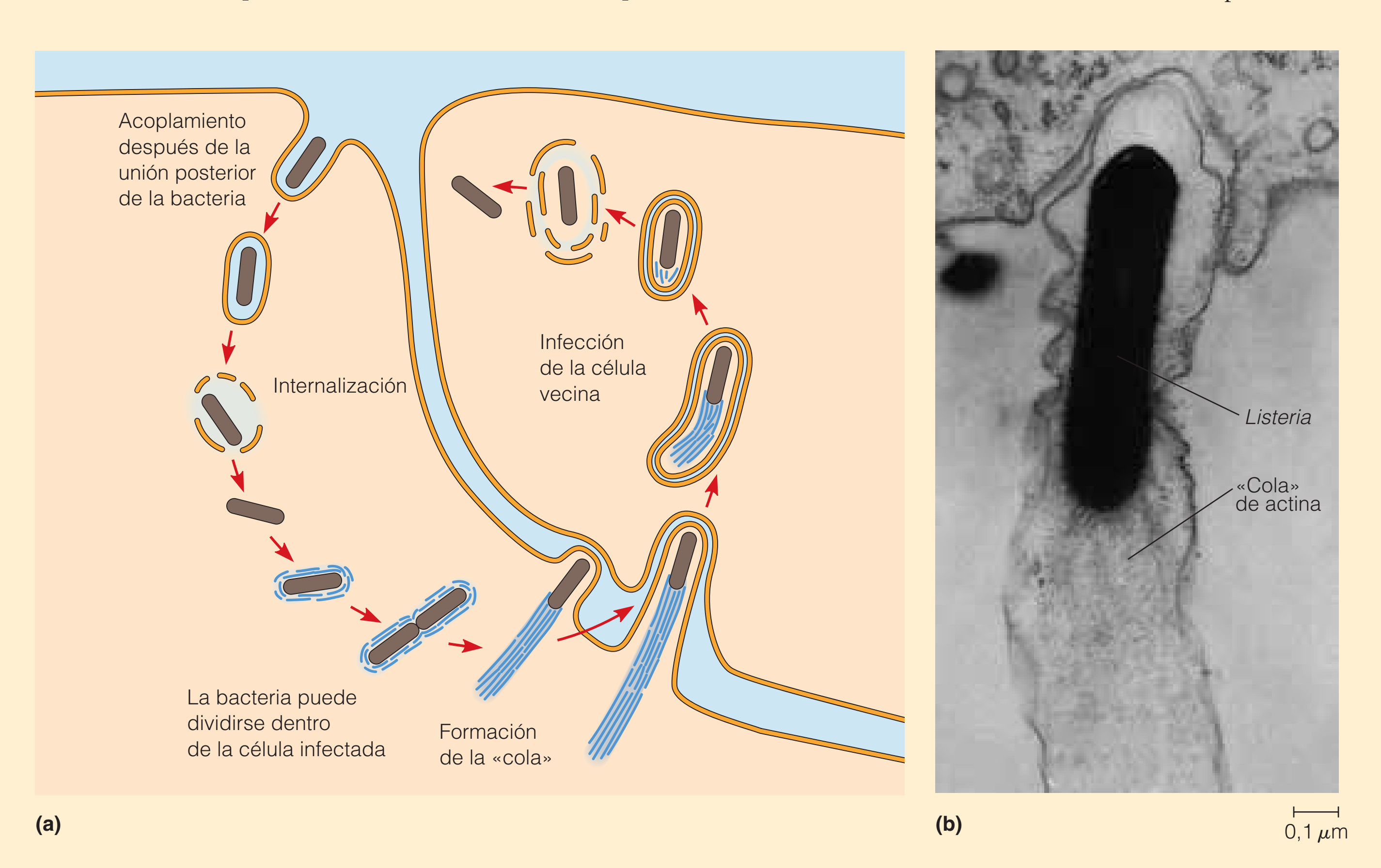


Figura 15A.1 Infección de un macrófago por *Listeria monocytogenes*. (**a**) Ciclo vital de *Listeria*. Una bacteria se acopla a la superficie de una célula sin infectar. La bacteria después se mueve dentro de la célula, donde puede dividirse y producir más bacterias para posteriormente dispersarse a una célula vecina a través de la formación de «colas de cometa» de actina polimerizada. (**b**) Micrografía electrónica de transmisión, que muestra una célula de *Listeria* dentro de un macrófago infectado y la «cola de cometa» de filamentos de actina, en la parte posterior de la bacteria.

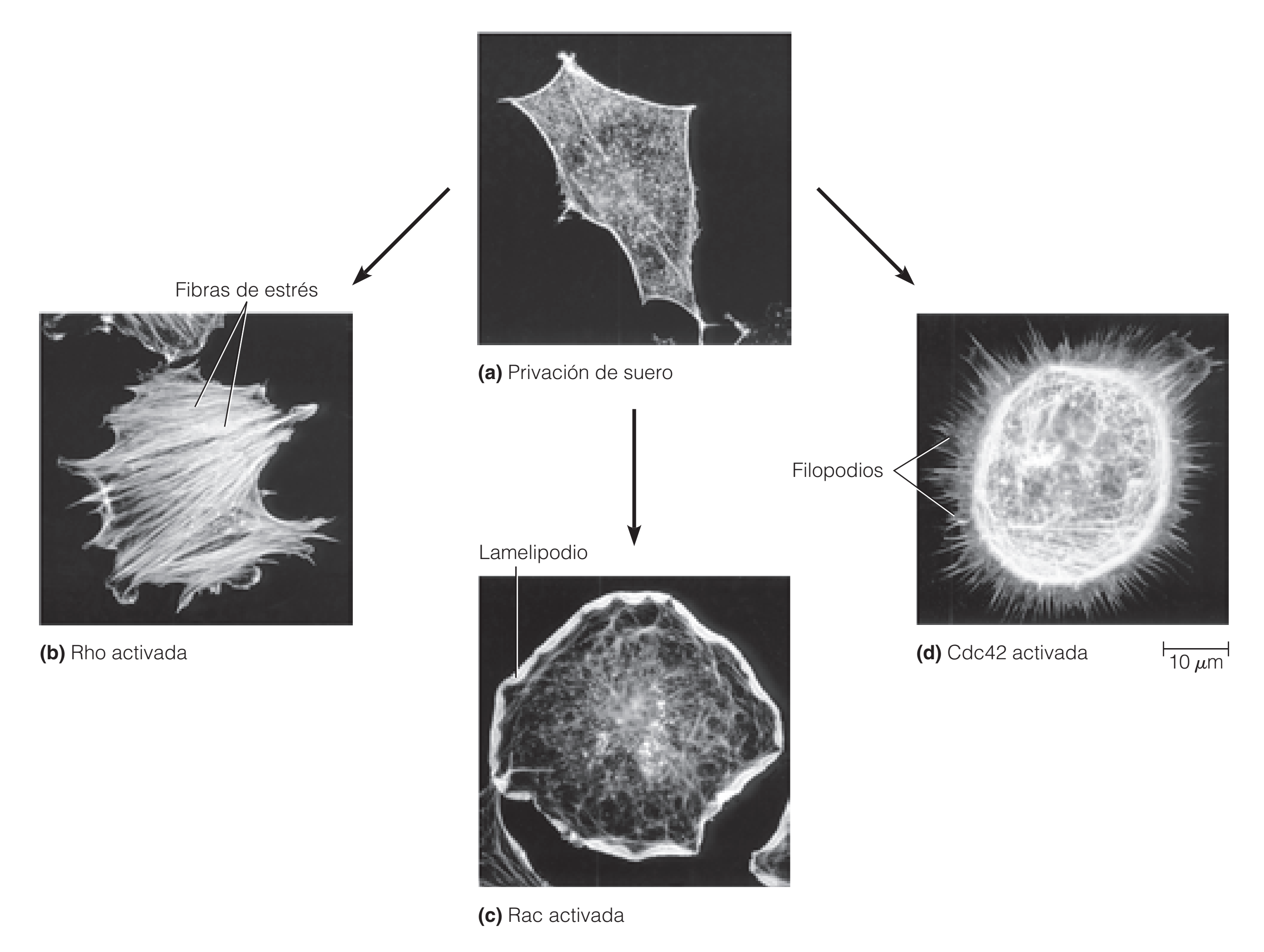


Figura 15.18 Regulación de las protrusiones por proteínas G monoméricas. (**a**) Si se tiñe la actina de un fibroblasto en cultivo en ausencia de factores de crecimiento («privación de suero»), se observan unos pocos haces de actina y una actividad de formación de protrusiones baja. (**b**) Las fibras de refuerzo se forman en situaciones que activan la ruta de señalización de Rho (como la adición del ácido lisofosfatídico, LPA). (**c**) Cuando se activa la vía de Rac (en este caso mediante la inyección de una forma Ras mutante, constitutivamente activa), se forman lamelipodios. (**d**) Si se activa Cdc42 (por ejemplo, a través de la inyección del factor de intercambio del nucleótido guanina que activa Cdc42), se forman filopodios.

blan en diferentes tipos de protrusiones. Una manera de conseguir esto, es a través de la activación de las proteínas WASP. Por ejemplo, Cdc42 activada, junto con PIP_2, pueden unirse a WASP y activarla, estimulando de esta manera la polimerización de actina por el complejo Arp2/3.

Las proteínas de unión a actina regulan la interacción entre microfilamentos

Como hemos visto, la polimerización de los MFs puede ser un proceso muy dinámico. Además, los MFs, como componentes estructurales del citoesqueleto, pueden formar una gran variedad de polímeros de actina con diferentes grados de organización y estabilidad. La estructura local del citoesqueleto de actina, depende del funcionamiento de **proteínas de unión a actina** y de cómo interaccionan éstas con los microfilamentos.

Un buen ejemplo de la función de las proteínas de unión a actina es el del **córtex celular**. El córtex celular es una malla tridimensional de microfilamentos y proteínas asociadas, localizada justo debajo de la membrana plasmática de casi todas las células animales. El córtex sostiene la membrana plasmática, confiere rigidez a la superficie celular, y facilita los cambios de forma y el movimiento celular. Una función importante de las proteínas de unión a actina en el córtex es agrupar a los MFs en una red estable con propiedades similares a un gel. Una de estas proteínas entrecruzadoras es la *filamina*, una molécula grande que está formada por dos polipéptidos iguales unidos por sus cabezas, y con un sitio de unión de actina en cada cola. Las moléculas de filamina actúan como «enganches», uniendo dos MFs en el punto donde se cruzan (Figura 15.19). De esta manera, los MFs se unen entre sí formando redes tridimensionales de gran tamaño.

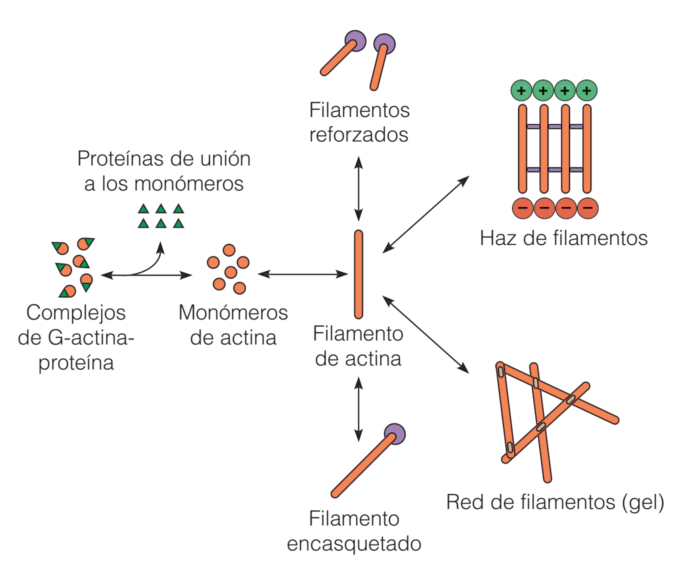
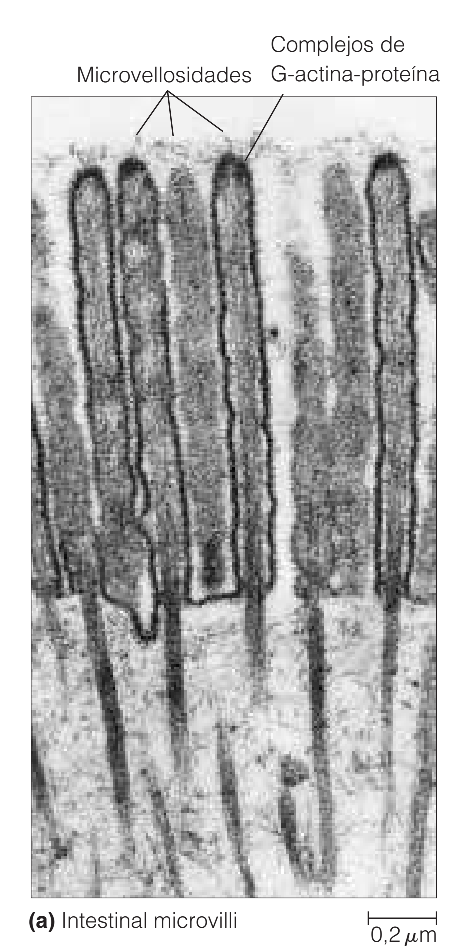


Figura 15.19 Relaciones entre las principales formas estructurales de actina. Las proteínas de unión a actina (verde, morado y canela) son las responsables de la conversión de los filamentos de actina de una forma a otra.

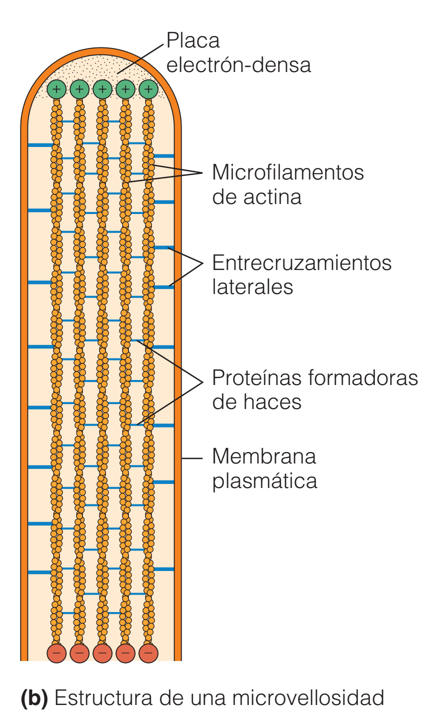
Otras proteínas desempeñan el papel opuesto, rompiendo la red de microfilamentos y provocando que el gel cortical de actina se licue y ablande. Llevan a cabo esta función mediante el reforzamiento y/o el encasquetamiento de los MFs; en algunas ocasiones la misma proteína puede desempeñar ambas funciones. Una de estas proteínas reforzantes y encasquetadoras es la *gelsolina*, cuya función es romper los MFs de actina y encasquetar los extremos *más* recién expuestos, impidiendo su polimerización posterior. La gelsolina es otra proteína de unión de actina que puede ser regulada mediante su unión a polifosfoinosítidos; cuando la gelsolina se une a un polifosfoinosítido específico, ya no es capaz de encasquetar el extremo *más* de un MF, permitiendo al extremo sin encapuchar sufrir cambios en su longitud.

Los haces de filamentos de actina forman el núcleo de las microvellosidades

A diferencia de la poca organización que presenta la actina en el córtex celular, otras estructuras formadas por actina en células no migradoras pueden estar altamente organizadas. El ejemplo mejor estudiado de polímeros de actina altamente organizados es el de los haces de filamentos que se encuentran en las microvillosidades. Las **microvillosidades** (o **microvilli**; en singular: **microvillus**) son un rasgo muy importante de las células de la mucosa intestinal (Figura 15.20a). Por ejemplo, una sola célula del intestino delgado, tiene cientos de microvellosidades, cada una de ellas



(a) Intestinal microvilli



(b) Estructura de una microvellosidad

Figura 15.20 Estructura de un microvellosidad. (**a**) Micrografía electrónica de las microvellosidades de las células de la mucosa intestinal (TEM). (**b**) Diagrama esquemático de una única microvellosidad, que muestra el núcleo de microfilamentos que confiere a la microvellosidad su particular rigidez. El núcleo está formado por varias docenas de haces de microfilamentos orientados con sus extremos *más* hacia la punta y con el extremo *menos* hacia la célula. Los extremos *más* están embebidos en una placa amorfa electrón-densa. Los MFs están unidos fuertemente uno a otro a través de proteínas formadoras de haces (entrecruzadoras) y se conectan a la superficie interna de la membrana plasmática mediante entrecruzamientos laterales.

de 1-2 μm de longitud y 0,1 μm de diámetro, lo que aumenta la superficie de la célula unas 20 veces. Esta área tan grande es esencial para la función intestinal, ya que la absorción del alimento digerido requiere una superficie de absorción grande.

Como se ilustra en la Figura 15.20b, el corazón de una microvellosidad intestinal está formado por un haz de microfilamentos. El extremo *más* está dirigido hacia la punta, donde queda unido a la membrana a través de una placa amorfa electrón-densa. Los MFs del haz están unidos a la membrana plasmática además por entrecruzamientos laterales formados por las proteínas *miosina I* y *calmodulina*. Estos entrecruzamientos se extienden hacia fuera 20-30 nm desde el haz hasta contactar con la placa electrón-densa de la superficie interna de la membrana. Los MFs adyacentes se mantienen unidos fuertemente dentro del haz, a través de la unión a intervalos regulares de las proteínas entrecruzadoras *fimbrina* y *villina* (llamadas también proteínas formadoras de haces de actina).

En la base de la microvellosidad, el haz de MFs se extiende formando una red de filamentos conocida como la **red terminal** (Figura 15.21). Los filamentos de ésta están compuestos principalmente por miosina y *espectrina*, que conectan los microfilamentos entre sí, con proteínas de la membrana plasmática, y posiblemente también con los filamentos intermedios que se hallan bajo la red terminal. La red terminal supuestamente confiere rigidez a las microvellosidades anclando sus haces de MFs de tal manera que se proyecten erguidos desde la superficie celular.

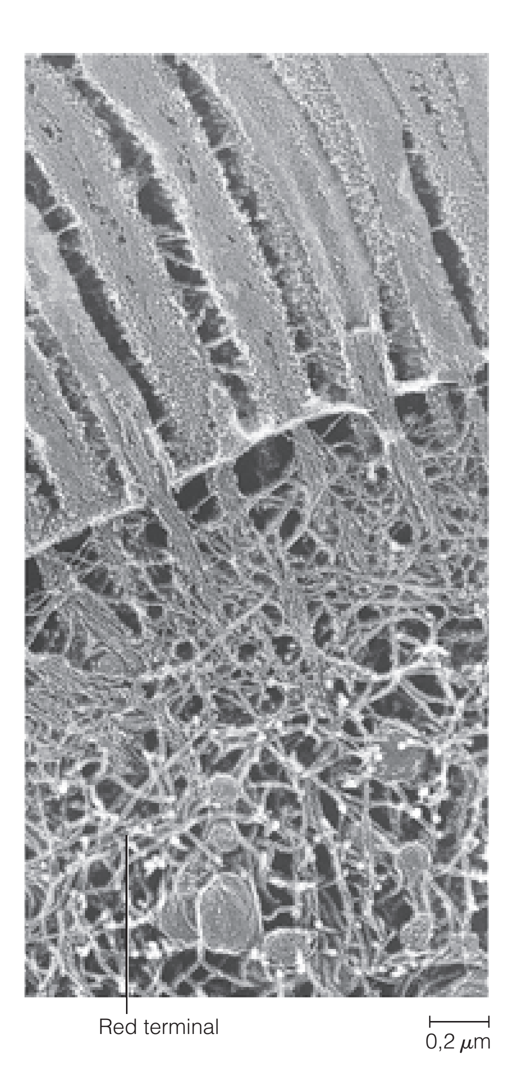


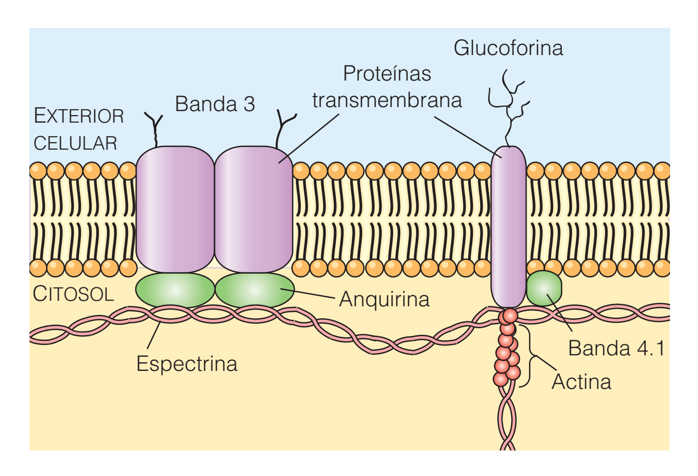
Figura 15.21 Red terminal de una célula epitelial intestinal. La red terminal que subyace a la membrana plasmática se puede observar en esta micrografía electrónica de criograbado profundo de una célula epitelial del intestino. El núcleo de las microvellosidades está formado por haces de microfilamentos, que se extienden formando en una red terminal.

La actina se une a las membranas por múltiples proteínas

Hemos visto que los microfilamentos participan en el soporte de estructuras relacionadas con membranas, como las microvellosidades de las células epiteliales. Los MFs participan íntimamente en el movimiento celular y en el estrangulamiento de la membrana celular durante la citocinesis. Para llevar a acabo estas funciones, los MFs deben estar conectados a la membrana plasmática. La unión de los MFs a la membrana plasmática es indirecta y requiere una o más proteínas de unión que anclen los MFs a proteínas transmembrana de la membrana plasmática.

Las proteínas de unión a actina de la familia FERM (*banda 4.1, ezrina, radixina* y *moesina*), son un grupo de proteínas cuya función general parece ser la de unir los microfilamentos a las membranas. Si estas proteínas están mutadas, muchos procesos celulares como la citocinesis, la secreción y la formación de microvellosidades se ven afectados. Las proteínas del eritrocito espectrina y anquirina (mencionada en el Capítulo 7) constituyen otro ejemplo de cómo la actina se puede unir a las membranas. Como se ilustra en la Figura 15.22, la membrana plasmática del eritrocito está cimentada por una red de filamentos de espectrina que están entrecruzados con cadenas muy cortas de actina. Esta red se conecta a la membrana plasmática a través de las proteínas anquirina y banda 4.1, que unen los filamentos de espectrina a proteínas transmembrana específicas.

Existen proteínas parecidas a la espectrina, la anquirina y la banda 4.1 en otras células animales además del eritrocito. Por ejemplo, en el extremo apical de las células epiteliales se encuentra la banda 4.1. La mutación de estas proteínas en *Drosophila* y en el nematodo *Caenorhabditis elegans* impiden la organización de las células epiteliales o su capacidad de cambiar la forma. Éste y otros muchos experimentos demuestran que la membrana plasmática está soportada por una red cortical de microfilamentos, y que la unión de esta red a la superficie celular es un requisito indispensable para el funcionamiento normal de las células animales.



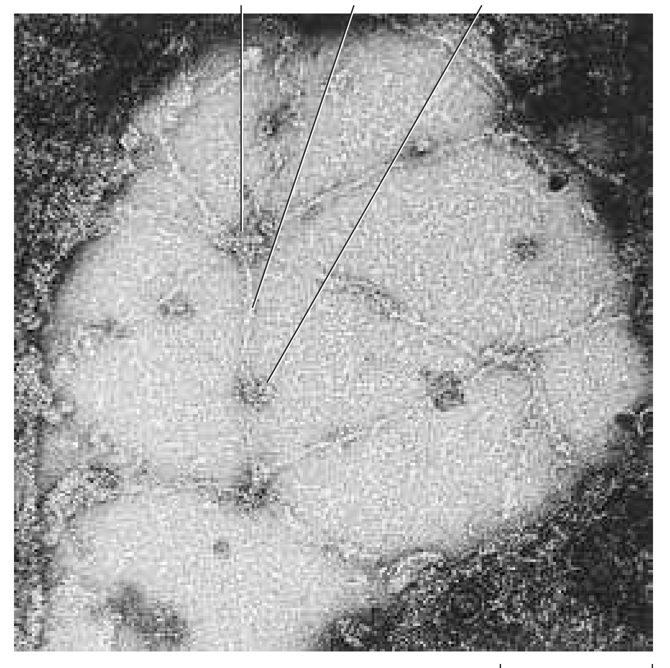


Figura 15.22 Sostén de la membrana plasmática de un eritrocito por una red de actina-espectrina-anquirina. La membrana plasmática de un glóbulo rojo está cimentada en su superficie interna por una red filamentosa que aporta flexibilidad y resistencia a la célula. Largos filamentos de espectrina se entrecruzan con filamentos cortos de actina. La red se ancla a la proteína transmembrana banda 3, por medio de la proteína anquirina.

Filamentos intermedios

Los filamentos intermedios (IFs) tienen un diámetro aproximado de 8-12 nm, lo que les confiere un tamaño intermedio entre los microtúbulos y los microfilamentos (*véase* Tabla 15.1), o entre los filamentos finos (actina) y gruesos (miosina) en las células musculares, donde se describieron por primera vez. Hasta la fecha, la mayoría de las investigaciones se han centrado en las células animales, donde los IFs se encuentran solos o formando haces, y donde parece que desempeñan un papel estructural o de mantenimiento de la tensión. La Figura 15.23 es una micrografía electrónica de los IFs de un fibroblasto humano en cultivo.

Los filamentos intermedios son el elemento más estable y menos soluble de los constituyentes del citoesqueleto. El tratamiento de las células con detergentes o con soluciones de elevada o baja fuerza iónica, elimina la mayor parte de los microtúbulos y de los microfilamentos, y otras proteínas del citosol, pero no la red de filamentos intermedios, que mantienen su forma original. Muchos científicos sugieren que, gracias a esta estabilidad, los IFs funcionan como un andamiaje que soporta toda la estructura del citoesqueleto. A diferencia de los MTs y los MFs, los IFs parecen no tener polaridad.

Las proteínas de los filamentos intermedios son específicas para cada tejido

Los filamentos intermedios sólo se encuentran en organismo pluricelulares, y a diferencia de los microtúbulos y de los microfilamentos, presentan una secuencia de aminoácidos muy diferente de un tejido a otro. En función del tipo celular en el que se encuentren, podemos diferenciar seis clases de IFs (Tabla 15.3). Las clases I y II comprenden a las *queratinas*, las proteínas que constituyen los tonofilamentos de las células epiteliales que tapizan las superficies del cuerpo y bordean sus cavidades. (Los IFs que se observan bajo la red terminal de la célula de la mucosa intestinal de la Figura 15.21, están formados por queratina.) Las queratinas de clase I son *queratinas ácidas*, mientras que las de clase II son *queratinas básicas* o *neutras*; cada una de estas clases está formada por al menos 15 queratinas diferentes.

La clase III de IFs la componen la vimentina, la desmina y la proteína gliofibrilar ácida. La *vimentina* está presente en el tejido conjuntivo y en otras células derivadas de células no epiteliales. Los filamentos de vimentina son constituyentes importantes en fibroblastos en cultivo, donde forman una red radial que se origina en el centro y que se extiende hasta la periferia de la célula. La *desmina* se encuentra en las células musculares y la *proteína gliofibrilar ácida* (*GFA*) es característica de las células gliales que rodean y aíslan a las células nerviosas. La clase IV de IFs la constituyen las *proteínas de los neurofilamentos* (*NF*) que se encuentran en los neurofilamentos de las células nerviosas. La clase V son las *láminas nucleares* A, B y C, que forman un andamio filamentoso bajo la superficie interna de la membrana nuclear de prácticamente todas las células eucariotas. Los neurofilamentos de las células embrionarias del sistema nervioso están formados por *nestina*, que constituye la clase VI.

A medida que se han ido secuenciando las proteínas de los IFs y sus genes, ha quedado claro que estas proteínas están codificadas por una única (aunque grande) familia de genes relacionados y que, por lo tanto, pueden ser clasificadas también en función de la similitud en su secuencia de

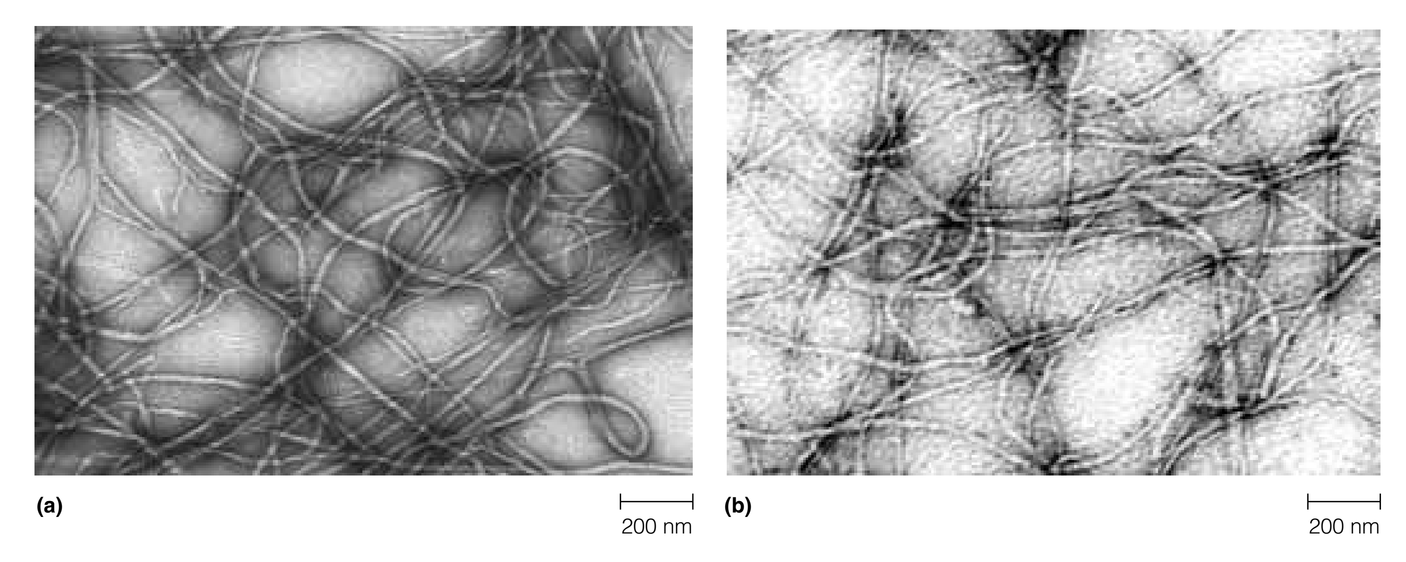


Figura 15.23 Filamentos intermedios. Micrografías electrónicas de filamentos intermedios reconstituidos in vitro y teñidos mediante tinción negativa (**a**) Filamentos formados por queratina 5 y 14. (**b**) filamentos de vimentina (TEM).

Tabla 15.3 Clases de filamentos intermedios

Clase	Proteína del IF	Peso molecular (kDa)	Tejido	Función
I	Citoqueratinas ácidas	40-56,5	Células epiteliales	Resistencia mecánica
II	Citoqueratinas básicas	53-67	Células epiteliales	Resistencia mecánica
III	Vimentina	54	Fibroblastos; células de origen mesenquimal; cristalino	Mantenimiento de la forma celular
III	Desmina	53-54	Células musculares, especialmente del músculo liso	Soporte estructural para la maquinaria contráctil
III	Proteína GFA	50	Células gliales y astrocitos	Mantenimiento de la forma celular
IV	Proteínas de los neurofilamentos		Sistema nervioso central y periférico	Rigidez axonal. Determinan el tamaño del axón
	NF-L (ligeros)	62		
	NF-M (intermedios)	102		
	NF-H (pesados)	110		
V	Láminas nucleares		Todos los tipos celulares	Forman un andamiaje nuclear para
	Lámina A	70		dar forma al núcleo
	Lámina B	67		
	Lámina C	60		
VI	Nestina	240	Células madre nerviosas	Desconocida

aminoácidos. Utilizando este criterio, se han distinguido seis clases de proteínas de los IFs (Tabla 15.3).

Debido a la especificidad tisular de los IFs, se pueden distinguir las células animales de diferentes tejidos atendiendo al tipo de IF presente, utilizando el microscopio de inmunofluorescencia. Esta *determinación por el tipo de filamento intermedio* se utiliza como herramienta diagnóstica en medicina. La determinación del tipo de IF es especialmente útil en el diagnóstico del cáncer, ya que se sabe que las células tumorales mantienen las proteínas de IF características del tejido en el que se han originado, independientemente de dónde se encuentre el tumor en el cuerpo. Habida cuenta de que el tratamiento apropiado depende con frecuencia del tejido de origen, la determinación del IF es especialmente valiosa en los casos donde el diagnóstico por las técnicas de microscopía convencionales es difícil.

Los filamentos intermedios se forman a partir de subunidades filamentosas

Todos los IFs son producto de una familia de genes relacionados y poseen rasgos comunes, aunque presentan diferencias significativas en el tamaño y en las propiedades químicas. A diferencia de la actina y la tubulina, que son proteínas globulares, los IFs son proteínas filamentosas. Todas las proteínas de los IFs tienen un dominio central en

forma de bastón de 310-318 aminoácidos, notablemente conservado en tamaño, estructura secundaria y, en cierto sentido, en su secuencia. Como se muestra en la Figura 15.24, el dominio central está formado por cuatro segmentos de hélices enrolladas, separados por segmentos enlazadores cortos. A ambos lados del dominio central helicoidal se encuentran los extremos N- y C-terminal, que difieren mucho en tamaño, secuencia y función entre las distintas proteínas de los IFs y que presumiblemente explican la diversidad funcional de estas proteínas.

En la Figura 15.25 se muestra un posible modelo del ensamblaje de los IFs. La unidad estructural básica de los filamentos intermedios la forman dos polipéptidos de IF entrelazados formando una *espiral sobreenrollada*). Los dominios centrales helicoidales de cada polipéptido están alineados paralelamente, con las regiones N- y C-terminal sobresaliendo como dominios globulares en cada extremo. Dos de estos dímeros se alinean lateralmente y forman un *protofilamento* tetramérico. Los protofilamentos interaccionan unos con otros y se asocian superponiéndose lateral y longitudinalmente para formar una estructura filamentosa. Un filamento intermedio, cuando está plenamente ensamblado, tiene un diámetro de ocho protofilamentos en cualquier punto, con los protofilamentos probablemente solapados por sus extremos de forma escalonada.

Los filamentos intermedios confieren resistencia mecánica a los tejidos

Los filamentos intermedios se consideran importantes determinantes estructurales en muchas células y tejidos. Los filamentos intermedios se localizan con frecuencia en lugares de la célula sometidos a estrés mecánico, por lo que se cree que desempeñan una función de resistencia a la tensión. Por ejemplo, en las células epiteliales, los *tonofilamentos* compuestos de queratina, rodean unas placas conocidas como *desmosomas*, que son puntos de unión fuertes entre dos células vecinas (*véase* Figura 17.18). Otra estructura algo diferente, el *hemidesmosoma*, establece conexiones entre la superficie basal de una célula epitelial y la matriz extracelular (*véase* Figura 17.17). El sistema de demosomas, hemidesmosomas y tonofilamentos soporta la mayor parte de la tensión mecánica cuando el epitelio se ve sometido a un estiramiento. La modificación genética de los filamentos de queratina de los queratinocitos en un ratón transgénico, tiene como consecuencia que las células epidérmicas sean frágiles y se rompan fácilmente. En el ser humano, existen mutaciones naturales en las queratinas, que provocan una enfermedad en la que se producen frecuentes ampollas en la piel, denominada *epidormolisis bullosa simple (EBS)*. También se sospecha la existencia de defectos en los IFs en otras condiciones patológicas, como la *esclerosis lateral amiotrófica (ALS)*, y en ciertos tipos de cardiomiopatías, que se originan por defectos en la organización del músculo cardíaco.

Aunque nuestro análisis de los IFs pueda dar la impresión de que son estructuras estáticas, esto no es cierto. Por ejemplo, en las neuronas, los IFs son transportados y remodelados de una manera dinámica. Otros IFs forman el andamiaje estructural en la superficie interna de la membrana nuclear denominado *lámina nuclear* (se tratará detalladamente en el Capítulo 19). La lámina nuclear está compuesta por tres IFs diferentes llamados lámina nuclear A, B y C. La fosforilación y el desensamblaje de estas láminas forman parte del proceso de desorganización de la envuelta nuclear al inicio de la mitosis. Después de la mitosis, las fosfatasas de las láminas eliminan los grupos fosfato, y permiten que la envuelta nuclear pueda agregarse de nuevo.

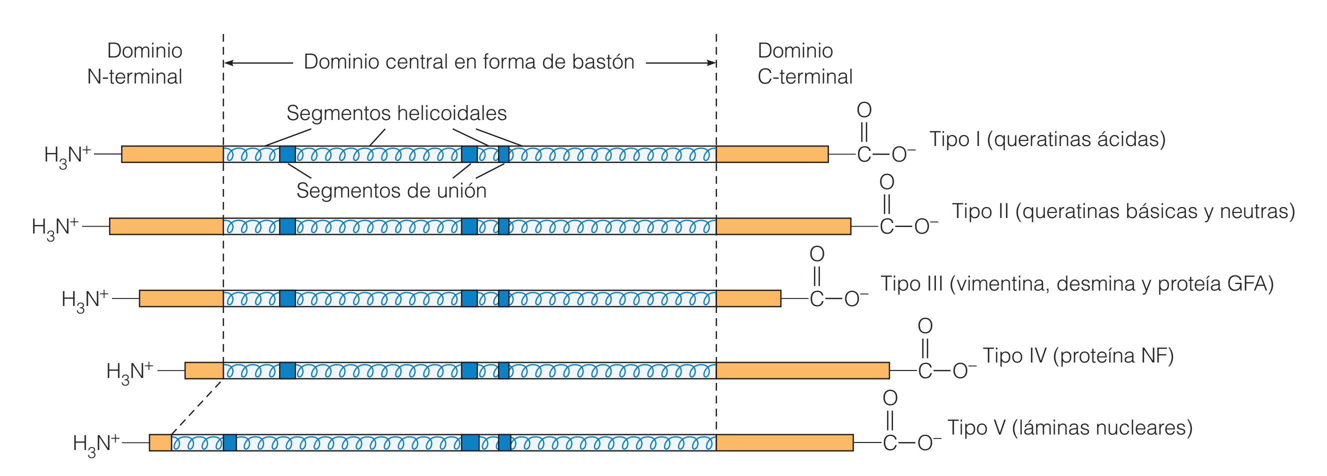


Figura 15.24 **Similitudes estructurales en las proteínas de los filamentos intermedios.** Los seis tipos de proteínas de los filamentos intermedios tienen un dominio central en forma de bastón formado por cuatro segmentos helicoidales que están interrumpidos por tres segmentos enlazadores. Se cree que el dominio central desempeña un papel importante en el ensamblaje del IF. Este dominio está altamente conservado en tamaño, estructura secundaria y secuencia, si bien las homologías se restringen a las regiones helicoidales. En los tipos del I al IV, los segmentos helicoidales presentan 276 aminoácidos y los segmentos de unión no son helicoidales. En los del tipo V, los segmentos helicoidales contienen 318 aminoácidos y sus segmentos de unión son también helicoidales. Los dominios N- y C-terminal que flanquean la parte central no son helicoidales y son mucho más variables tanto en tamaño como en secuencia. (La estructura del sexto tipo, nestina, no se muestra.)

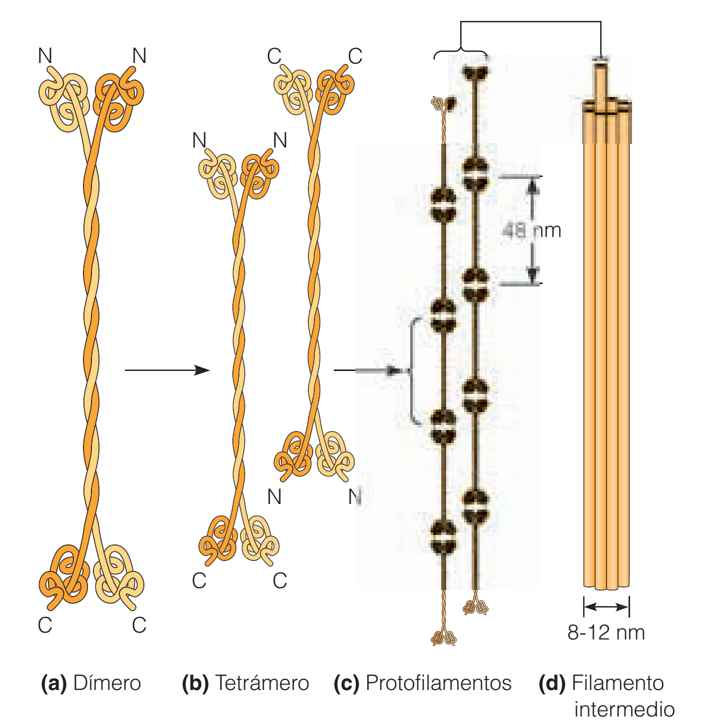


Figura 15.25 Modelo del ensamblaje de los filamentos intermedios in vitro. (**a**) El punto de partida para el ensamblaje es una pareja de polipéptidos IF. Los dos polipéptidos son idénticos en todos los IFs, excepto en los filamentos de queratina, que son obligatoriamente heterodímeros, con un polipéptido del tipo I y otro del tipo II. Los dos polipéptidos se enrollan uno sobre el otro formando una hélice enrollada de dos cadenas, con sus dominios centrales conservados alineados paralelamente. (**b**) Dos dímeros se alinean lateralmente para formar un protofilamento tetramérico. (**c**) Los protofilamentos se ensamblan en filamentos más largos a través del alineamiento por sus extremos o por los laterales. (**d**) Se considera que el filamento intermedio está completamente ensamblado cuando tiene un grosor de ocho protofilamentos en cualquier punto.

El citoesqueleto es una estructura integrada mecánicamente

En los apartados anteriores, hemos considerado los diferentes componentes del citoesqueleto como entidades separadas. Cuando observamos por primera vez las fotografías del citoesqueleto, parece una red enmarañada poco organizada. En realidad, la arquitecura celular depende de las propiedades únicas de los diferentes componentes del citoesqueleto, actuando de una manera conjunta. Normalmente se piensa que los microtúbulos resisten la distorsión cuando se comprime a una célula, mientras que los microfilamentos funcionan como elementos contráctiles que generan tensión. Los filamentos intermedios son elásticos y pueden resistir fuerzas de tensión.

La integración mecánica de los filamentos intermedios, los microfilamentos y los microtúbulos es posible gracias a la acción de proteínas de unión que los conectan entre sí. Recuerde que los desmosomas y los hemisdesmosomas están unidos a los filamentos intermedios a través de los miembros de la familia de proteínas de la *plaquina*, como la *plectina*, *desmoplaquina* y *el antígeno 1 pemfigoide bulloso* (BPAG1; *véase* Capítulo 17). Dichas uniones proporcionan la resistencia mecánica a los desmosomas y hemidesmosomas. Sin embargo, la función de las plaquinas como nexos mecánicos no se reduce únicamente a los desmosomas y hemidesmosomas. Por ejemplo, la plectina es una proteína de unión versátil que se encuentra en lugares de conexión entre los filamentos intermedios y los microfilamentos o los microtúbulos (Figura 15.26). La plectina, al igual que otras plaquinas, posee sitios de unión para los filamentos intermedios, los microfilamentos y los microtúbulos. A través de la unión de estos tres polímeros principales, las plaquinas participan en la formación de una red citoesquelética mecánicamente integrada. Como resultado, las estructuras del citoesqueleto pueden adaptarse a las fuerzas de estiramiento de tal manera, que los elementos que soportan la tensión, se alinean en la dirección del estrés. Las propiedades de resistencia al estrés, son especialmente importantes en las células epiteliales, como las células que revisten el intestino. Estas células están sometidas a constante tensión, ya que el músculo liso de la pared intestinal se contrae, presionando sobre el contenido del intestino.

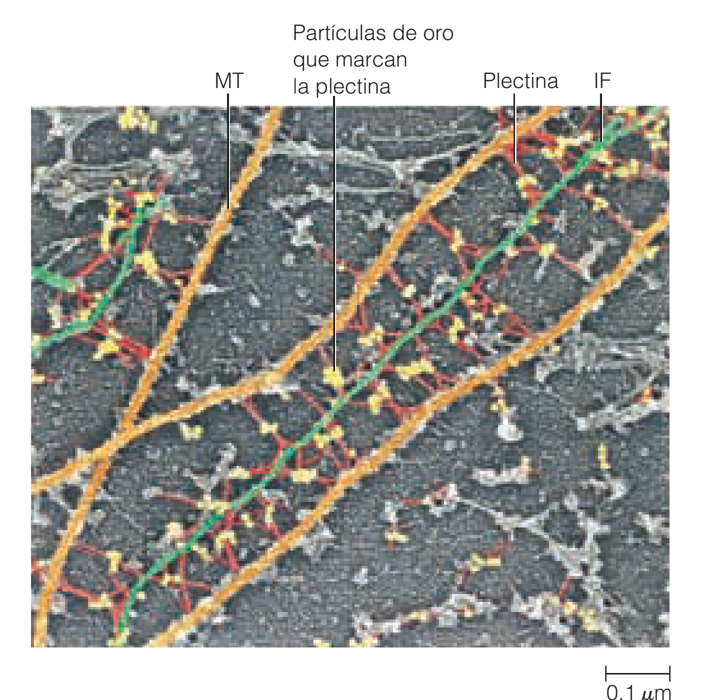


Figura 15.26 Conexiones entre los filamentos intermedios y otros componentes del citoesqueleto. Los filamentos intermedios están conectados tanto a los microtúbulos como a los filamentos de actina a través de una proteína llamada plectina. La plectina (en rojo) une los IFs (en verde) a los MTs (en naranja). La plectina está marcada con partículas de oro (en amarillo). Las plectinas pueden unir también MFs de actina (no se muestra). Los IFs sirven aquí como conectores fuertes a la vez que elásticos, entre los diferentes filamentos del citoesqueleto.

Perspectiva

El citoesqueleto es un elemento estructural de las células eucariotas, que se puede observar muy bien mediante videomicroscopía digital, microscopía electrónica y microscopía de inmunofluorescencia. Consiste en una red tridimensional amplia de microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios, que determina la forma celular y que permite los movimientos celulares.

Los microtúbulos (MTs) son tubos huecos cuyas paredes están formadas por heterodímeros de tubulina α y β polimerizadas linealmente, formando protofilamentos. Los MTs son estructuras polares y que crecen preferentemente por uno de sus extremos, conocido como extremo *más*. Los microtúbulos fueron identificados por primera vez como constituyentes de estructuras del axonema de cilios y flagelos y del huso mitótico de las células en división, y están reconocidos hoy en día como un elemento básico de la mayoría de las células eucariotas. Los microtúbulos pueden sufrir ciclos de acortamiento catastrófico o de crecimiento, un fenómeno que se conoce como inestabilidad dinámica. En el interior celular, la dinámica y crecimiento de los MTs está dirigida por los centros organizadores de microtúbulos (MTOCs). El centrosoma es un MTOC importante, que contiene sitios de nucleación ricos en tubulina γ, necesaria para nuclear el crecimiento del MT. Los microtúbulos se estabilizan a lo largo de su extensión y en sus extremos *más*, por medio de proteínas asociadas a los microtúbulos.

Los microfilamentos (MFs) son polímeros de actina de doble cadena que fueron descubiertos inicialmente por la función que desempeñan en las fibrillas contráctiles de las células musculares; actualmente se les reconoce como un componente de casi todas las células eucariotas. Los microfilamentos son necesarios en muchos procesos celulares, como en la locomoción celular y en el mantenimiento de la forma de la célula. Al igual que los microtúbulos, los MFs son estructuras polares, en las que los monómeros de actina se incorporan preferentemente por un extremo y se eliminan por el otro. El ensamblaje de los MFs en la célula está regulado por las proteínas G monoméricas Rho, Ras y Cdc42, por los derivados del fosfatidilinositol, conocidos como polifosfoinosítidos, y por las proteínas casquete. Otras proteínas estabilizadoras de actina regulan la organización de los MFs en las células, desde los filamentos paralelos de la actina de las microvellosidades, a las redes de actina ramificada.

Los filamentos intermedios constituyen el componente más estable y menos soluble del citoesqueleto. Parecen desempeñar un papel estructural o de resistencia a la tensión. Los IFs son específicos de cada tejido y pueden utilizarse para la identificación del tipo celular. Dicha identificación del tipo es útil en el diagnóstico del cáncer, ya que se sabe que las células cancerosas conservan las proteínas de los IFs del tejido del que provienen. Todas las proteínas de los IFs tienen un domino central altamente conservado flanqueado por regiones terminales que difieren en tamaño y en secuencia, lo que presumiblemente justifica la diversidad funcional de las proteínas de los IFs. IFs, MTs y MFs están interconectados en la célula formando redes citoesqueléticas que pueden soportar la tensión y la compresión, y que proporcionan resistencia mecánica y rigidez a las células.

Con estos conocimientos, estamos ya preparados para enfrentarnos con el siguiente capítulo, donde exploraremos con más detalle la función de los microtúbulos y los microfilamentos, en la motilidad y contractilidad celular.

Problemas

Los problemas de mayor dificultad están marcados con un •.

15.1 Filamentos y túbulos. Indique si las siguientes afirmaciones son verdaderas para los microtúbulos (MT), los microfilamentos (MF), los filamentos intermedios (IF) o para ninguno de ellos (N). Alguna de las afirmaciones puede tener más de una respuesta.

(a) Implicados en la contracción muscular.

(b) Iimplicados en el movimiento de cilios y flagelos.

(c) Más importante para el movimiento de los cromosomas que para la citocinesis.

(d) Más importante para la citoquinesis que para el movimiento de los cromosomas, en las células animales.

(e) El que probablemente resistan al tratamiento de las células con detergentes no iónicos o con soluciones de elevada fuerza iónica.

(f) Se encuentran en las bacterias.

(g) Tienen diferente composición en las células musculares y en las células nerviosas.

(h) Pueden detectarse con microscopía de inmunofluorescencia.

(i) Las funciones que desempeñan en el movimiento celular son bien conocidas.

(j) Se ensamblan a partir de protofilamentos.

15.2 Verdadero, falso o depende. Indique cuál de las siguientes afirmaciones es verdadera (V), falsa (F), o depende (D), entendiéndose como depende una afirmación que puede ser verdadera o falsa dependiendo de las circunstancias. Explique por qué, en los casos que responda V o F.

(a) El extremo *menos* de los microtúbulos y de los microfilamentos se llama así porque en él, las subunidades se pierden y no se añaden.

(b) La energía necesaria para la polimerización de la tubulina y de la actina la proporciona la hidrólisis de un nucleósido trifosfato.

(c) Los microtúbulos, los microfilamentos y los filamentos intermedios coexisten, en una célula eucariota típica, en un equilibrio dinámico con un reservorio de subunidades proteicas.

(d) El tratamiento con latrunculina A bloquearía los movimientos intracelulares de *Listeria*.

(e) Una célula de un alga no tiene ni tubulina ni actina

(f) Todas las subunidades proteicas de los filamentos intermedios están codificados por genes de la misma familia génica.

(g) Todos los microtúbulos de las células animales tienen su extremo *menos* anclado al centrosoma.

(h) Mientras los monómeros de actina continúen incorporándose al extremo *más* de un microfilamento, éste continuará creciendo.

15.3 Estudios del citoesqueleto. A continuación se describen los resultados de estudios recientes de las proteínas del citoesqueleto. Exponga en cada caso, la conclusión que se puede sacar de los resultados.

(a) Las vesículas pigmentarias de las células epidérmicas de los peces, se agregan o se dispersan en respuesta al tratamiento con ciertas sustancias químicas. Cuando se añade nocodrazol a las células cuyos gránulos de pigmentos han sido inducidos previamente a la agregación, los gránulos no pueden dispersarse de nuevo.

(b) Cuando se trata con colchicina una célula animal, sus microtúbulos se depolimerizan y prácticamente desaparecen. Si posteriormente se retira la colchicina mediante lavados, los MTs aparecen de nuevo, comenzando en el centrosoma y creciendo hacia fuera con una tasa (1 μm/min) similar a la que polimeriza la tubulina in vitro.

(c) Cuando se introduce y se expresa un gen que codifica para la actina del músculo cardíaco en una célula en cultivo, que normalmente sólo sintetiza la actina del músculo esquelético, la proteína producida por el gen «forastero» se combina fácilmente con las moléculas de actina indígenas sin ningún efecto adverso sobre la forma o la función celular.

(d) Se ha observado que los extractos obtenidos de huevos de rana en fase G2 del ciclo celular, contienen estructuras que podrían inducir la polimerización de la tubulina en microtúbulos in vitro. El examen mediante inmunotinción de estas estructuras, revela que contienen pericentrina.

•**15.4 Estabilización y la concentración crítica**. Suponga que se ha determinado la concentración crítica global de una muestra de tubulina purificada. Después se añade una preparación de centrosomas (centros organizadores de microtúbulos), que nuclean los microtúbulos, de tal manera que el extremo *menos* queda unido al centrosoma y está estabilizado contra la depolimerización. Cuando se determina de nuevo la concentración crítica global, el resultado es diferente. Explique por qué cambia la concentración crítica global.

15.5 Polimerización de actina. Se puede seguir la polimerización de la actina-G en microfilamentos, utilizando actina marcada con pirenos y un aparato que mida la fluorescencia de la actina polimerizada en un tubo de ensayo. El aumento en la fluorescencia puede representarse frente al tiempo, de una manera similar a los experimentos de dispersión de la luz para medir la polimerización de la tubulina (Figura 15.27). Examine el gráfico e identifique cuál de las curvas corresponde a cada una de las siguientes situaciones. En cada caso, razone su respuesta.

(a) Adición sólo de actina unida a pirenos, en presencia de un tampón.

(b) Adición de actina unida a pirenos, junto con proteínas del complejo Arp2/3

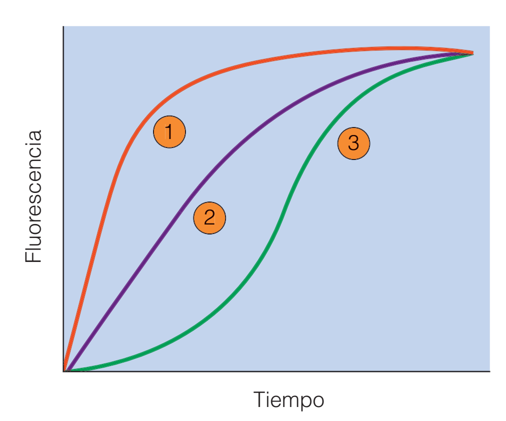


Figura 15.27 Cinética de la polimerización de la actina medida por la incorporación de actina unida a pirenos, en varias condiciones experimentales. (*Véase* Problema 15.5.)

(c) Adición de actina unida a pirenos, junto con proteínas purificadas del complejo Arp2/3 y un fragmento proteico purificado que corresponde a N-WASP activo (una proteína de la familia WASP)

•**15.6 Actina esponjosa.** Supongamos que usted está interesado en los efectos precisos de la citocalasina D sobre los microfilamentos, a lo largo del tiempo. Basándose en lo que conoce acerca del mecanismo de acción de las citocalasinas, dibuje diagramas de lo que les sucede a los microfilamentos en las células tratadas con la droga. En particular, explique por qué los polímeros de actina ya existentes, se despolimerizan al final.

•**15.7 Una nueva arruga.** Los fibroblastos se pueden meter en láminas finas de silicona. En condiciones normales, los fibroblastos ejercen la suficiente tensión sobre la silicona, para que se arrugue. Explique cómo se podría comparar la capacidad de los fibroblastos de arrugar la silicona, con la de las células normales, bajo las siguientes condiciones.

(a) Las células se inyectan con grandes cantidades de gelsolina purificada.

(b) Las células provienen de un ratón modificado por ingeniería genética, que carece de filamentos intermedios de vimentina.

(c) Las células se tratan con taxol.

(d) Las células se tratan con colchicina, la droga se elimina mediante lavados, y las células se observan periódicamente.

15.8 Activa, guste o no. Se pueden construir por ingeniería genética, formas constantemenete activas de las proteínas G monoméricas («constitutivamente activas»), o que actúen como «dominantes negativas». El efecto de estas últimas proteínas G es la desactivación permanente de la vía de señalización asociada con esa proteína G pequeña.

(a) Explique qué le sucederá a un fibroblasto en reposo en suero normal cuando se le introduce un dominante negativo de Rho.

(b) Explique qué le sucederá al mismo fibroblasto, si se le trata con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).

(c) Explique qué le sucederá a un fibroblasto al que se le ha introducido Rho constitutivamente activo cuando se le trata con ácido lisofosfatídico (LPA).

Bibliografía recomendada

Las referencias con importancia histórica están marcadas con •.

Técnicas para el estudio del citoesqueleto

•Bridgman, P. C. y T. S. Reese. The structure of cytoplasm in directly frozen cultured cells. 1. Filamentous meshworks and the cytoplasmic ground substance. *J. Cell Biol.* 99 (1980): 1655.

•Hirokawa, N. y J. E. Heuser. Quick-freeze, deep-etch visualization of the cytoskeleton beneath surface differentiations of intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* 91 (1981): 399s.

Microtúbulos

Bornens, M. Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. Curr. Opin. *Cell Biol.* 14 (2002): 25-34.

Desai, A. y T. Mitchison. Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.* 13 (1997): 83.

Gundersen, G. G., E. R. Gomes y Y. Wen. Cortical control of microtubule stability and polarization. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16 (2004): 1-7.

Joshi, H. C. Microtubule dynamics in living cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10 (1998): 35.

•Mitchison, T. y M. Kirschner. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312 (1984): 237.

Moritz, M. y D. A. Agard. Tubulin complexes and microtubule nucleation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11 (2001): 174.

Nicolaou, K. C., R. K. Guy, *et al.* Taxoids: New weapons against cancer. *Sci. Amer.* 274 (1996): 94.

Microfilamentos

Ayscough, K. R. In vivo functions of actin-binding proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10 (1998): 102.

Cameron, L. A., P. A. Giardini, F. S. Soo y J. A. Theriot. Secrets of actin-based motility revealed by a bacterial pathogen. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1* (2000): 110-119.

Etienne-Manneville S. y A. Hall. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420 (2002): 629-635.

Heintzelman, M. B. y M. S. Mooseker. Assembly of the intestinal brush border cytoskeleton. *Curr. Topics Dev. Biol.* 26 (1992): 93.

Pollard, T. D. y G. G. Borisy. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112 (2003): 453-465.

•Schroder, R. R., D. J. Manstein, W. Jahn, H. Holden, I. Rayment, K. C. Holmes y J. A. Spudich. Three-dimensional atomic model of F-actin decorated with Dictyostelium myosin S1. *Nature* 364 (1993): 171.

Stossel T. P., J. Condeelis, J. L. Cooley, J. H. Hartwig, A. Noegel, M. Schleicher y S. S. Shapiro. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (2001): 138-145.

Yin, H. L. y P. A. Janmey. Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Ann. Rev. Physiol.* 65 (2003): 761-789.

Filamentos intermedios

Fuchs, E. y D. W. Cleveland. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* 279 (1998): 514.

Herrmann, H. y U. Aebi. Intermediate filaments and their associates: Multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12 (2000): 79.

Ingber, D. E. The architecture of life. *Sci. Amer.* 278 (1998): 48.

16

Movimiento celular: motilidad y contractilidad

En el capítulo anterior, hemos estudiado el citoesqueleto de las células eucariotas y hemos visto que da forma a la célula y le proporciona un andamiaje intracelular que organiza ciertas estructuras en su interior. También hemos señalado que este andamiaje tiene una función dinámica en la motilidad celular. En este capítulo, analizaremos el papel que desempeñan estos elementos citoesqueléticos en la **motilidad** celular. Ésta comprendería el movimiento de una célula (o de un organismo completo) a través de su ambiente, el movimiento del ambiente por o a través de la célula, el movimiento de los componentes celulares dentro de la célula y el acortamiento de la propia célula. La **contractilidad**, un término utilizado frecuentemente para describir el acortamiento de las células musculares, representa una forma especializada de motilidad.

Sistemas móviles

La motilidad tiene lugar en el nivel tisular, celular y subcelular. Los ejemplos más notables de motilidad, particularmente en el mundo animal, tienen lugar en el nivel tisular. El tejido muscular de la mayoría de los animales está formado por células específicamente adaptadas para la contracción, y los movimientos que producen suelen ser evidentes, como en el caso del doblamiento de un miembro, el latido de un corazón o la contracción uterina durante el parto. En el ser humano, el músculo esquelético representa alrededor del 40% del peso corporal, y consume una cantidad significativa de nuestro presupuesto energético total.

En el nivel celular, la motilidad se observa en células individuales o en organismos que consisten en una o unas pocas células. Se puede observar en tipos celulares tan diferentes como un protozoo ciliado y un espermatozoide, y depende en cada caso de los cilios o de los flagelos, que son apéndices celulares adaptados para la propulsión. La migración celular durante la embriogénesis animal, el movimiento ameboide y la invasión de las células cancerosas en los tumores malignos, constituyen otros ejemplos de motilidad en el nivel celular.

El movimiento de componentes intracelulares es igualmente importante, y podríamos considerarlo como una motilidad en el nivel subcelular. Por ejemplo, los microtúbulos altamente organizados del huso mitótico desempeñan un papel crucial en la separación de los cromosomas durante la división celular, como veremos en el Capítulo 19. Además, en algunas células ocurre el fenómeno conocido como *corrientes citoplásmicas*, en el que el citoplasma está sujeto a un patrón rítmico de flujo. Otros ejemplos de trabajo mecánico en el nivel subcelular son los movimientos característicos de estructuras moleculares que ocurren durante el crecimiento y diferenciación celular. Un buen ejemplo de dicho proceso es el transporte de celulosa a la pared en crecimiento de una célula vegetal que se está dividiendo o diferenciando.

La motilidad representa un uso de la energía por parte de la célula particularmente intrigante, ya que en algunos casos supone la conversión directa de energía química en energía mecánica. Esto contrasta con la mayoría de aparatos mecánicos que generan movimiento a partir de sustancias químicas (como el motor de un automóvil, que depende de la combustión de la gasolina), que requieren una forma de energía intermedia, normalmente el calor o la electricidad. Como veremos más adelante, la energía nece-

saria para la motilidad celular proviene normalmente del ATP, cuya hidrólisis está acoplada con frecuencia a cambios en la forma de determinadas proteínas que intervienen en el movimiento. La eficacia de estos «motores» celulares en la transducción de la energía en trabajo mecánico varía, dependiendo del proceso. Los cálculos aproximados de dicha eficacia mecánica sugieren que ciertos motores celulares, como los implicados en la contracción de las células musculares o en el movimiento intracelular de vesículas, son tan eficaces y en algunos casos más, que los motores de los automóviles. En otros ejemplos, como los motores que intervienen en la mitosis, la eficacia es de varios órdenes de magnitud menor que la de las máquinas fabricadas por el hombre.

Los microtúbulos y microfilamentos del citoesqueleto proporcionan el andamiaje básico para **proteínas motoras** especializadas o **mecanoenzimas,** que interaccionan con el citoesqueleto para generar movimiento en el nivel molecular (Tabla 16.1). Los efectos combinados de estos movimientos moleculares provocan el movimiento en el nivel celular. En algunos casos, como en la contracción muscular, la combinación de muchas células moviéndose simultáneamente provocan el movimiento en el nivel tisular.

Existen dos sistemas principales de movilidad en los eucariotas. En el primero se producen interacciones entre los microtúbulos y motores moleculares especializados. Los microtúbulos son abundantes en la célula y se usan en una gran variedad de movimientos intracelulares. Un ejemplo específico del **movimiento basado en los microtúbulos,** es el *transporte axonal rápido*, uno de los procesos mediante el cual una célula nerviosa transporta materiales desde la zona central de la célula a las zonas periféricas. El segundo tipo de movilidad en los eucariotas está basado en las interacciones entre los microfilamentos de actina y los motores moleculares que pertenecen a la familia de la *miosina*. Un ejemplo conocido del **movimiento basado en los microfilamentos** es la *contracción muscular*. Comenzaremos el análisis detallado de los dos sistemas de motilidad con dos proteínas esenciales para el movimiento basado en los microtúbulos.

Tabla 16.1 Algunas proteínas motoras de las células eucariotas

Moléculas	Función típica
Proteínas asociadas a los microtúbulos	
Dineína citoplásmica	Movimiento hacia el extremo *menos* del microtúbulo
Dineína del axonema	Activación del deslizamiento en los microtúbulos flagelares
Quinesinas	Movimiento hacia el extremo *más* del microtúbulo
Proteínas asociadas a actina	
Miosina I, monómero	Movimiento a lo largo de los filamentos de actina
Miosina II, filamento	Deslizamiento de los filamentos de actina en el sarcómero de un músculo

Movimiento intracelular basado en los microtúbulos: quinesina y dineína

Los microtúbulos (MTs) constituyen un conjunto de pistas rígidas para el transporte de varios orgánulos membranosos y de vesículas. Como vimos en el Capítulo 15, el centrosoma organiza y orienta los MTs, debido a que el extremo *menos* de la mayoría de los microtúbulos se encuentra embebido en el centrosoma. El centrosoma se encuentra normalmente cerca del centro de la célula, por lo que se podría considerar el tráfico hacia el extremo *menos* como tráfico «entrante». El tráfico dirigido hacia los extremos positivos podría ser considerado por la misma razón como «saliente», porque se dirige hacia la periferia de la célula.

Los microtúbulos proporcionan una serie de vías organizadas por las que se pueden mover los orgánulos, pero no son ellos los que generan la fuerza necesaria para el movimiento. El trabajo mecánico que se necesita para el movimiento depende de las **proteínas motoras asociadas a los microtúbulos (MAPs motoras)**, que se unen a los orgánulos y después «caminan» a lo largo del MT, siendo el ATP quien proporciona la energía necesaria. Además, las MAPs motoras reconocen la polaridad del MT y cada MAP motora tiene una preferencia en la dirección del movimiento. Hasta la fecha, se conocen dos familias principales de MAPs motoras: quinesinas y dineínas (Tabla 16.1).

Las MAPs motoras desplazan orgánulos a lo largo de los microtúbulos, durante el transporte axonal

La neurona es un tipo celular con una gran importancia histórica en el estudio del movimiento intracelular basado en los microtúbulos. Especialmente, el axón gigante de calamar ha sido extremadamente útil para la purificación de los componentes que interaccionan con los MTs (para más detalles sobre el axón gigante de calamar, consultar la Figura 13.10). Un receptor o un neurotransmisor que se sintetice en el soma de la neurona se debe transportar a distancias de hasta un metro entre el soma y el terminal nervioso. Este transporte es necesario debido a que los ribosomas están presentes únicamente en el soma, por lo que no puede haber síntesis proteica, ni en los axones, ni en los botones sinápticos. En su lugar, las proteínas y las vesículas se sintetizan en el soma y se transportan a lo largo de los axones hasta los botones sinápticos. Por supuesto, se requiere algún mecanismo de transporte dependiente de energía, y éste lo proporciona el movimiento dependiente

de los MTs. Este proceso se denomina **transporte axonal rápido** y consiste en el movimiento de vesículas que contienen proteínas y otros orgánulos a lo largo de los MTs (no trataremos el transporte axonal lento, que no se conoce bien).

La participación de los microtúbulos en el transporte axonal se propuso tras la observación de que este proceso se bloqueaba por la colchicina y otras drogas que inhiben la función de los microtúbulos, pero no se veía afectado por drogas como las citocalasinas, que afectan a los microfilamentos. Desde entonces, los MTs se han visualizado a lo largo del axón mediante la técnica del criograbado profundo (una técnica que se describe en el Apéndice), y se han perfilado como componentes importantes del citoesqueleto axonal. Es más, los MTs axonales tienen asociadas pequeñas vesículas membranosas y mitocondrias (Figura 16.1).

Las pruebas de que una MAP motora dirige los movimientos de los orgánulos, se obtuvieron de unos experimentos en los que se observó que los orgánulos podían desplazarse a lo largo de unas finas estructuras filamentosas en el axoplama aislado (el citoplasma de los axones) en presencia de ATP. El movimiento de los orgánulos fue observado a través de microscopía de contraste interferencial diferencial mejorada por vídeo (que se describe también en el Apéndice). La velocidad del movimiento del orgánulo fue aproximadamente de 2 μm/seg, un valor comparable al observado en neuronas intactas. Los investigadores combinaron a continuación la fluorescencia y la microscopía electrónica para demostrar que los filamentos a lo largo de los cuales se desplazaban los orgánulos, eran los microtúbulos. Concluyeron de esta manera que el transporte axonal dependía de la interacción de los orgánulos con los MTs.

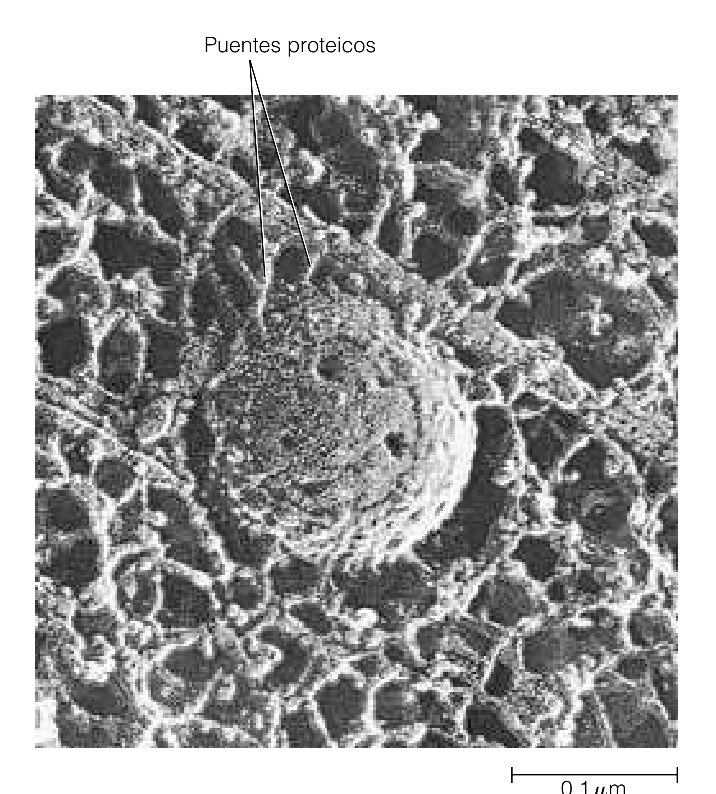


Figura 16.1 **Micrografía de grabado profundo que muestra una vesícula unida a un microtúbulo en el axón del cangrejo de río.** La membrana de la vesícula se une al microtúbulo a través de puentes proteicos.

Desde entonces se han purificado y caracterizado dos MAPs motoras responsables del transporte axonal rápido, la quinesina y la dineína citoplásmica. Con el fin de determinar la dirección del transporte por estas MAPs motoras, se utilizaron proteínas purificadas para dirigir el transporte de microesferas de poliestireno a lo largo de microtúbulos con polaridad conocida. Para obtener estos microtúbulos de polaridad conocida, se indujo la polimerización de la tubulina usando centrosomas y centros organizadores de microtúbulos, que aseguraban su polimerización con el extremo *menos* anclado al centrosoma. Cuando se añadían las esferas de poliestireno junto con quinesina y ATP a los MTs polimerizados en los centrosomas, las microesferas se movían hacia los extremos *más* (es decir, alejándose del centrosoma). Este descubrimiento implica que en una célula nerviosa, la quinesina medía el transporte desde el soma al terminal nervioso, a través del axón (este transporte se denomina *transporte axonal anterógrado*). Cuando se llevaron a cabo experimentos similares añadiendo dineína purificada, las partículas se desplazaron en dirección contraria, hacia los extremos *menos* de los MTs (este transporte se conoce como *transporte axonal retrógrado*). Estos dos motores transportan materiales en direcciones opuestas dentro del citoplasma (Figura 16.2).

Las quinesinas se mueven a lo largo de los microtúbulos a través de la hidrólisis de ATP

Las quinesinas se identificaron por primera vez en el axón gigante de calamar. Estas quinesinas «clásicas» constan de tres partes: una cabeza globular que se une a los microtúbulos y que está implicada en la hidrólisis del ATP, una región helicoidal, y una cadena ligera que está implicada en la unión de la quinesina a otros orgánulos o proteínas (*véase* Figura 16.3a). El movimiento de las moléculas de quinesina a lo largo de los MTs se ha estudiado mediante el uso de esferas unidas a la quinesina, o midiendo la fuerza ejercida por una única molécula de quinesina, utilizando fibra de vidrio calibrada o un tipo de rayos láser conocidos como «pinzas ópticas». Es fácil visualizar este movimiento si lo comparamos al caminar, con las cabezas globulares actuando como pies (Figura 16.3b). Las quinesinas clásicas se mueven a lo largo de los MTs con pasos de 8 nm: una de las dos cabezas globulares se adelanta para contactar con una subunidad nueva de β tubulina, la cabeza globular trasera se suelta, y queda libre para unirse a una nueva región

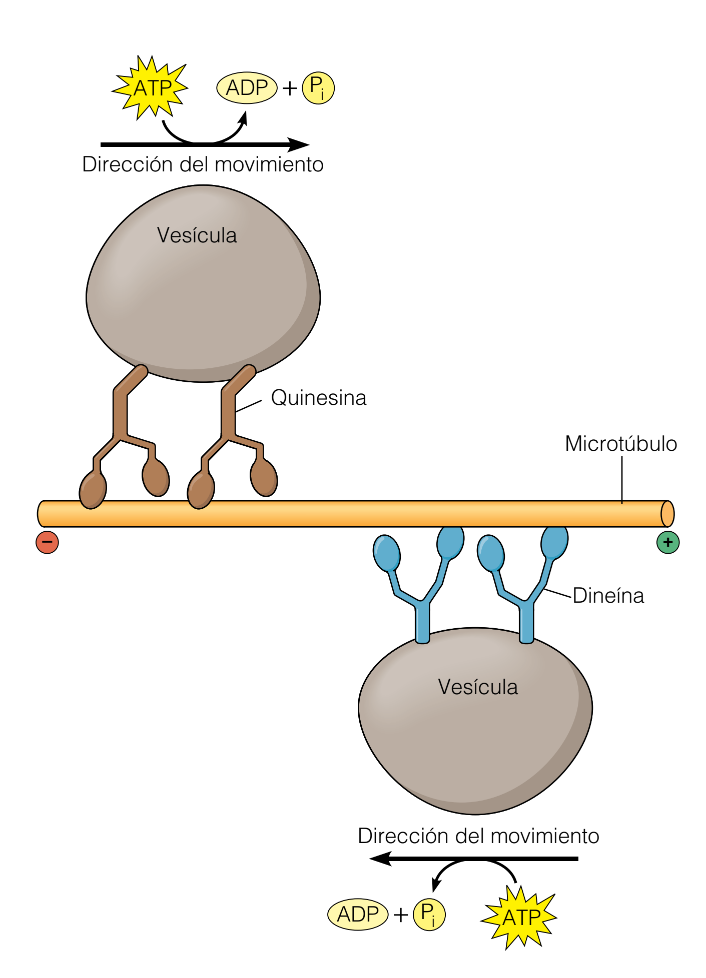
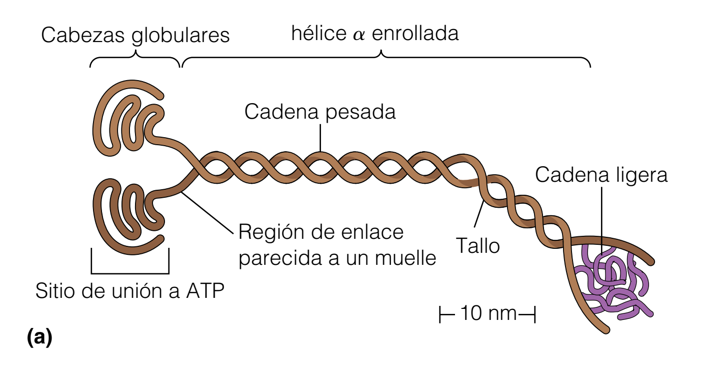


Figura 16.2 Motilidad basada en los microtúbulos. Las quinesinas y las dineínas son familias de moléculas que utilizan la energía de hidrólisis del ATP para «caminar» a lo largo de los microtúbulos. Durante dicho proceso, transportan estructuras intracelulares a lo largo del MT. En general, los miembros de la familia de las quinesinas transportan vesículas u orgánulos hacia los extremos *más* del MT —es decir, desde el centro de la célula a la periferia—. La dineína se desplaza en dirección contraria, hacia los extremos *menos* del MT, y por tanto hacia el centro de la célula donde se localiza el MTOC.



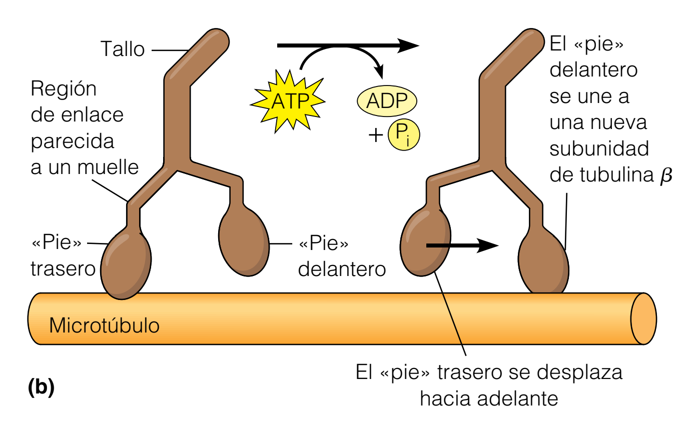


Figura 16.3 Movimiento de la quinesina. (**a**) Estructura básica de una molécula de quinesina. (**b**) Las quinesinas «caminan» a lo largo de los microtúbulos. El «pie» delantero, una de las dos cabezas globulares de la quinesina, se despega de una subunidad de tubulina β tras la hidrólisis de ATP, y avanza. Posteriormente el pie trasero se libera hidrolizando ATP y salta hacia delante, rebasando al otro pie (modelo «mano sobre mano»).

del MT. Este movimiento en el que las dos cabezas se turnan alternativamente para ser el «pie» delantero, se conoce como «mano sobre mano» (por analogía a la técnica pianística en la que una mano pasa por encima de la otra, quedando ambas cruzadas). El movimiento está acoplado al intercambio de ATP y ADP en sitios específicos de las cabezas. El resultado es que la quinesina se mueve hacia el extremo *más* de un MT, consumiendo ATP. La quinesina manifiesta *procesividad*, es decir, una única molécula puede cubrir grandes distancias antes de despegarse de un MT. Se ha calculado que el recorrido puede llegar a ser de 1 μm, lo que constituye una gran distancia, si tenemos en cuenta su tamaño. La quinesina parece ser un motor molecular bastante eficaz; su eficiencia en la transformación de la energía de la hidrólisis del ATP en trabajo útil, se sitúa en torno al 60-70%.

Las quinesinas son una gran familia de proteínas, con funciones y estructuras variadas

Desde el descubrimiento de la primera quinesina implicada en el transporte anterógrado en las neuronas, se han descrito muchas proteínas que presentan similitudes estructurales con la quinesina. Estas proteínas o **KIFs**, que conforman **la familia de la quinesina**, presentan un dominio motor similar, pero que puede localizarse en diferentes lugares, dependiendo de la molécula en cuestión. En algunos casos, las KIFs se asocian con otra KIF idéntica o con otra diferente. Existe una clase de KIFs que funcionan como motores con dirección al extremo *menos*, en vez de al extremo *más*, una propiedad que no depende de la región motora, sino de otras regiones. en diversos estudios bioquímicos e inmunocitoquímicos, así como el estudio de organismos mutantes, se ha puesto de manifiesto que las KIFs participan en muchos procesos celulares diferentes. Por ejemplo, están implicados en el movimiento y localización de determinadas sustancias dentro de la célula. Algunas KIFs se encuentran en el huso mitótico o meiótico o los cinetocoros, donde desempeñan un papel en las etapas

tempranas de la mitosis y de la meiosis (*véase* Capítulo 19). Otras quinesinas participan en la finalización de la mitosis y en la citoquinesis. Por ejemplo, las células de la mosca de la fruta o de nematodos que sean mutantes para una de estas KIFs, son capaces de iniciar la citoquinesis, pero el surco de segmentación no acaba de profundizar y la división celular fracasa.

Las dineínas pueden agruparse en dos clases principales: del axonema y citoplasmáticas

La familia de las MAPs motoras de la dineína está formada por dos tipos principales: las dineínas citoplásmicas y las dineínas del axonema (Tabla 16.1). A diferencia de las quinesinas y de las KIFs, sólo se han identificado unas pocas dineínas. Las **dineínas citoplásmicas** poseen dos cadenas pesadas que pueden interaccionar con los microtúbulos, tres cadenas intermedias y cuatro cadenas ligeras. En contraste con la mayoría de las quinesinas, las dineínas citoplásmicas se desplazan hacia el extremo *menos* de los MTs. Otra diferencia con las quinesinas y las KIFs, es que las dineínas citoplásmicas no pueden unirse de una manera eficaz a los orgánulos por sí mismas. Para ello, necesitan asociarse a un complejo conocido como **dinactina** (Figura 16.4). La dinactina ayudará a la dineína a unirse a su carga (por ejemplo, una vesícula) que transporta a lo largo de los MTs, mediante la unión a proteínas de la membrana de la carga, como la espectrina.

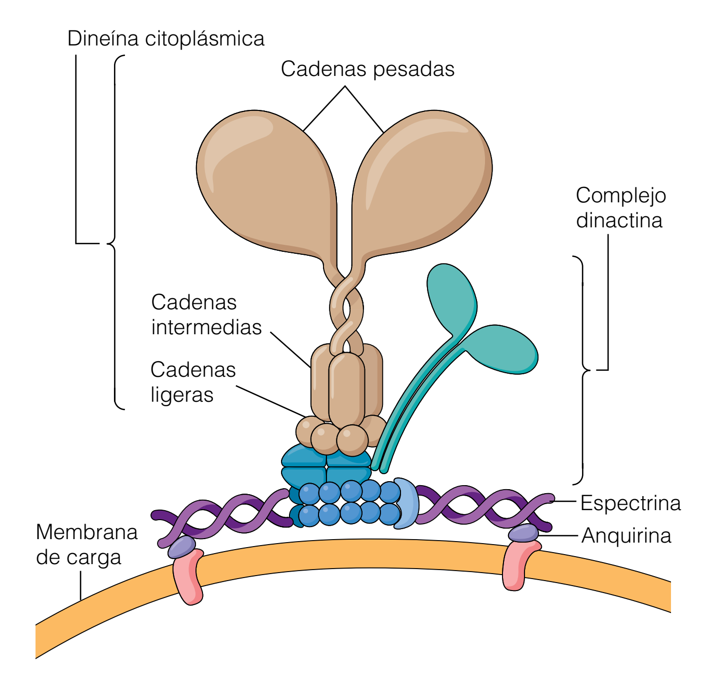


Figura 16.4 **Esquema de la dineína citoplásmica/dinactina.** La dineína citoplásmica se une a la membrana de su carga indirectamente a través del complejo multiproteico dinactina. La dinactina se une a la espectrina situada en la membrana de la vesícula de carga.

Se han identificado al menos cuatro tipos de **dineínas del axonema**. Trataremos posteriormente en detalle la función de éstas en los cilios y los flagelos.

Las MAPs motoras participan en el transporte intracelular de vesículas

Hemos visto que la célula posee un sistema de transporte de vesículas elaborado que está dirigido por la quinesina y la dineína citoplásmica o por MAPs motoras similares. Una pregunta lógica es ¿para qué es necesario dicho transporte y cómo se usa? Hasta el momento hemos visto que son imprescindibles para el transporte axonal rápido y la división celular. Las MAPs motoras desempeñan además un papel fundamental en la distribución y estructura del retículo endoplásmico, la formación del complejo de Golgi, el movimiento de los lisosomas y gránulos secretores, la internalización de vesículas desde la membrana plasmática, y en una variedad de movimientos de vesículas en las células animales. Examinaremos ahora más detalladamente una de estas funciones, la formación del complejo de Golgi.

Como hemos visto en el Capítulo 12, el complejo de Golgi consiste en una pila de membranas aplanadas localizadas en la región del centrosoma. La función del complejo de Golgi es recibir las proteínas fabricadas en el retículo endoplásmico (RE) y procesarlas y empaquetarlas para su distribución a las zonas celulares correspondientes. En cada una de las etapas de este proceso, las proteínas se transportan en vesículas. Existe, por lo tanto, un flujo continuo de vesículas hacia y desde el complejo de Golgi. Las vesículas son transportadas sobre los microtúbulos gracias a MAPs motoras (Figura 16.5).

Las vesículas que viajan desde el RE hasta el complejo de Golgi parecen ser transportadas por motores similares a la dineína, que las mueven hacia los extremos *menos* de los microtúbulos. Los extremos *menos* están anclados en el centrosoma, por lo que todas las vesículas fabricadas por el RE en varias partes de la célula, se desplazan hacia el centrosoma. Estas vesículas se fusionan y entran a formar parte de la pila de membranas que conforman una cara del complejo de Golgi.

Se ha demostrado en varios experimentos que el transporte dependiente de microtúbulos es crucial para el mantenimiento de las cisternas del complejo de Golgi. Por ejemplo, si se induce la despolimerización de los MTs con la droga nocodazol (*véase* Capítulo 15), se produce la dispersión del complejo de Golgi. Cuando se retira el nocodazol y se lava, el complejo de Golgi se vuelve a formar. Igualmente, si se induce a las células a sobre expresar una de las subunidades del complejo dinactina, se bloquea su función, con el correspondiente colapso del complejo de Golgi y la interrupción del transporte de intermediarios desde el RE al complejo del Golgi.

Una vez dentro del complejo de Golgi, las proteínas son procesadas a medida que se desplazan a través de las

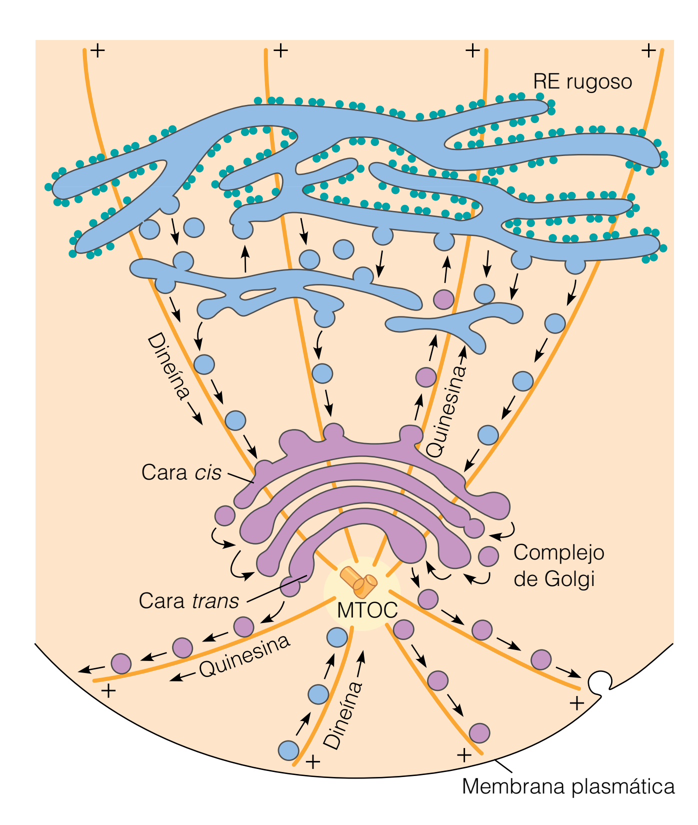


Figura 16.5 Microtúbulos, MAPs motoras y el complejo de Golgi. Un modelo de movimiento. Las vesículas que viajan hacia y desde el complejo de Golgi están unidas a los microtúbulos y se piensa que son transportadas por MAPs motoras como la quinesina, la dineína o proteínas similares. La dineína es una MAP con movimiento dirigido hacia el extremo *menos*, mientras que la quinesina lo es hacia el extremo *más*. De esta manera, las vesículas originadas en el RE o en la membrana plasmática son transportadas hacia el complejo de Golgi y el MTOC por la dineína, mientras que las vesículas originadas en el complejo de Golgi se transportan hacia el RE o la periferia celular, por medio de las quinesinas.

cisternas. La proteína terminada emerge —todavía empaquetada en vesículas— por el otro lado del complejo de Golgi. Las MAPs motoras de movimiento dirigido hacia el extremo *más* llevan las vesículas terminadas lejos del complejo de Golgi y con destino a la periferia de la célula. Se ha observado que el transporte de vesículas es defectuoso, en organismos que presentan mutaciones en varias KIF, lo que proporciona una evidencia directa de la importancia de estas MAPs motoras en el transporte de vesículas dirigido hacia el extremo *más*. Por lo tanto, las MAPs motoras y los microtúbulos posibilitan un tráfico bidireccional de vesículas desde y hacia el complejo de Golgi.

Además de las proteínas motoras asociadas a los microtúbulos, existen otras que también participan en el transporte de vesículas, las miosinas no musculares (*véase* más adelante). La manera en que el citoesqueleto de microtúbulos y de actina interaccionan para dirigir el movimiento de vesículas, constituye un área interesante de investigación hoy en día.

Movimientos basados en los microtúbulos

Los cilios y los flagelos son apéndices móviles propios de las células eucariotas

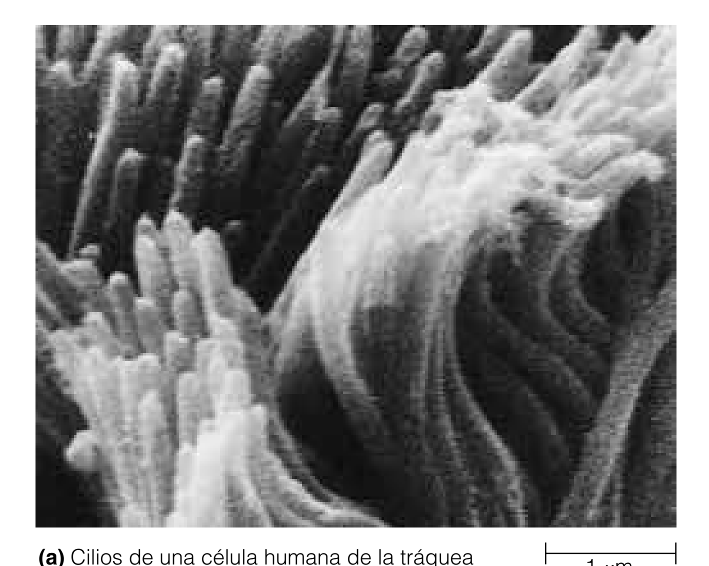
Los microtúbulos no sólo son cruciales para los movimientos intracelulares, sino también para el movimiento de *cilios* y *flagelos*, los apéndices móviles de la célula eucariota. Ambos apéndices tienen la misma base estructural y sólo se diferencian en su longitud, en el número por célula, y en la manera en que baten. Los **cilios** (en latín *cilia*, singular *cilium*) tienen un diámetro aproximado de 0,25 μm y una longitud entre 2 y 10 μm de largo, y suelen presentarse en un número elevado en la superficie de las células ciliadas. Cada cilio está rodeado por una extensión de la membrana plasmática y es por lo tanto una estructura intracelular.

Los cilios están presentes tanto en los organismos eucariotas unicelulares como en los pluricelulares. Los organismos unicelulares, como los protozoos, utilizan los cilios tanto para la locomoción como para la recolección de partículas alimenticias. En los organismos pluricelulares, los cilios sirven principalmente para hacer pasar el medio alrededor de la célula más que para impulsar la célula por el medio. Por ejemplo, las células que tapizan los conductos aéreos del tracto respiratorio humano, presentan varios cientos de cilios cada una, lo que implica que cada centímetro cuadrado del tejido que tapiza el tracto respiratorio, ¡presenta alrededor de un billón de cilios! (Figura 16.6a). El batido coordinado de estos cilios es el responsable de expulsar de los pulmones todo el moco, el polvo, las células muertas y las materias extrañas. Uno de los efectos nocivos del humo del tabaco es que inhibe el batido ciliar. Otras enfermedades respiratorias leves pueden atribuirse también a defectos en los cilios.

Los cilios baten de manera similar a un remo, con un golpe fuerte perpendicular al cilio, que genera una fuerza paralela a la superficie celular. Los cilios de la superficie celular normalmente baten de una manera coordinada, asegurando así un movimiento constante de fluido por la superficie celular. El ciclo del batido de un cilio epitelial se puede observar en la Figura 16.6b. Cada ciclo dura entre 0,1 y 0,2 seg y está compuesto por un golpe enérgico de batido, seguido por la recuperación.

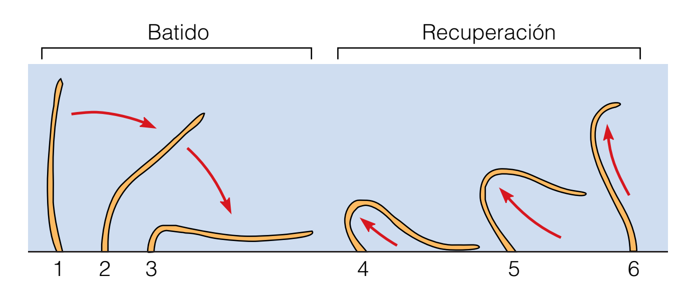
Los **flagelos** (en latín, *flagella*, singular *flagellum*) mueven a la célula a través de un medio fluido. Aunque tienen el mismo diámetro que los cilios, frecuentemente los flagelos son mucho más largos —desde 1 μm hasta varios milímetros, aunque normalmente miden de 100 a 200 μm— y suelen estar limitados a uno o unos pocos por célula (Figura 16.6c). Al igual que los cilios, los flagelos están rodeados por una extensión de la membrana plasmática.

Los flagelos presentan un batido de naturaleza diferente al de los cilios. Los flagelos se mueven con un movimiento curvo propagado, que normalmente es simétrico y

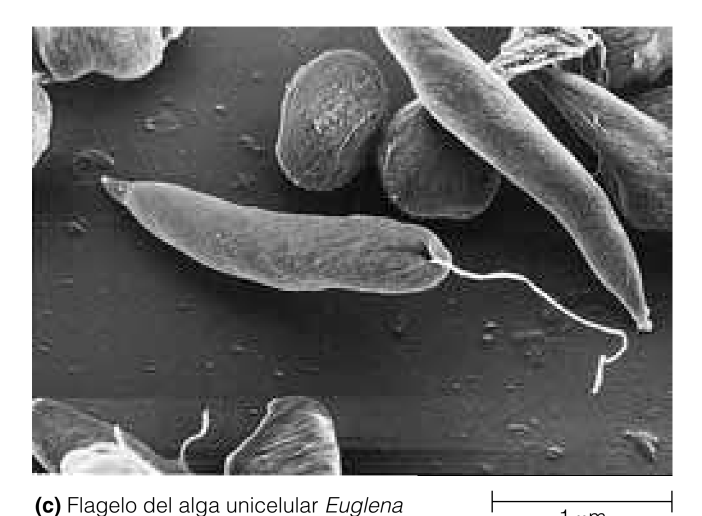


(a) Cilios de una célula humana de la tráquea

1 μm

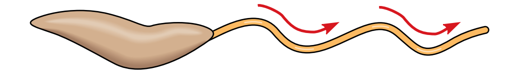


(b) Batido de un cilio



(c) Flagelo del alga unicelular *Euglena*

1 μm



(d) Movimiento de una célula flagelada

Figura 16.6 Cilios y flagelos. (**a**) Micrografía de los cilios de una célula de la tráquea de un mamífero (SEM). (**b**) Batido de un cilio en la superficie de una célula epitelial del tracto respiratorio humano. El batido comienza con una generación de potencia que barre el fluido de la superficie de la célula. Le sigue un movimiento de recuperación, que deja el cilio preparado para el siguiente batido. Cada ciclo dura 0,1-0,2 seg. (**c**) Micrografía del alga unicelular *Euglena* (SEM). (**d**) Movimiento de una célula flagelada a través de un medio acuoso.

ondulatorio, e incluso puede presentar un patrón helicoidal. Este tipo de batido genera una fuerza paralela al flagelo, de tal manera que la célula se desplaza en la misma dirección que el eje del flagelo. El patrón de locomoción de la mayoría de las células flageladas consiste en la propulsión de la célula por un flagelo trasero, pero se conocen casos en los que el flagelo precede a la célula. La Figura 16.6d ilustra este tipo de movimiento natatorio.

Los cilios y los flagelos están formados por un axonema unido a un corpúsculo basal

Los cilios y los flagelos poseen una estructura común que consiste en un **axonema**, o cilindro principal de túbulos, con un diámetro aproximado de 0,25 μm. El axonema está conectado a un **corpúsculo basal** y rodeado por una extensión de la membrana celular (Figura 16.7a). Entre el axonema y el corpúsculo basal existe una *zona de transición*, donde los microtúbulos cambian la disposición que tenían en el corpúsculo basal a la disposición característica del axonema. En la Figura 16.7b-d se muestran cortes transversales del axonema, de la zona de transición, y del corpúsculo basal.

El corpúsculo basal tiene una apariencia idéntica a la del centriolo. Está constituido por nueve grupos de estructuras tubulares organizadas alrededor de su circunferencia. Cada grupo se denomina *triplete* porque está formado por tres túbulos con sus paredes compartidas— un microtúbulo completo y dos microtúbulos incompletos—. En el proceso de formación de un cilio o flagelo, un centriolo migra a la superficie celular y contacta con la membrana plasmática. A continuación, el centriolo sirve como elemento de nucleación para el ensamblaje de MTs, comenzando la polimerización de los nueve dobletes externos del axonema. Una vez que el ensamblaje de los túbulos ha comenzado, el centriolo pasa a denominarse corpúsculo basal.

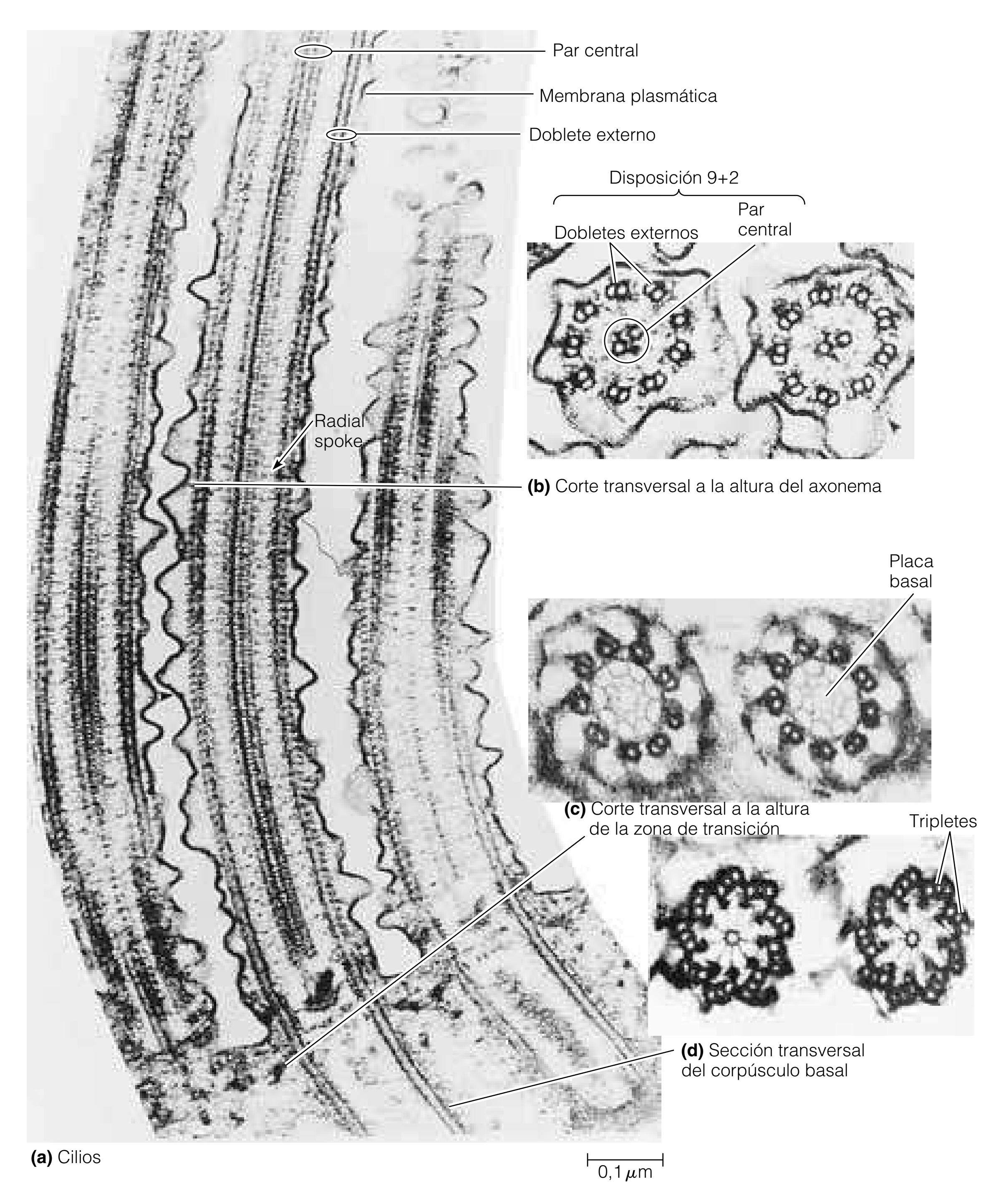
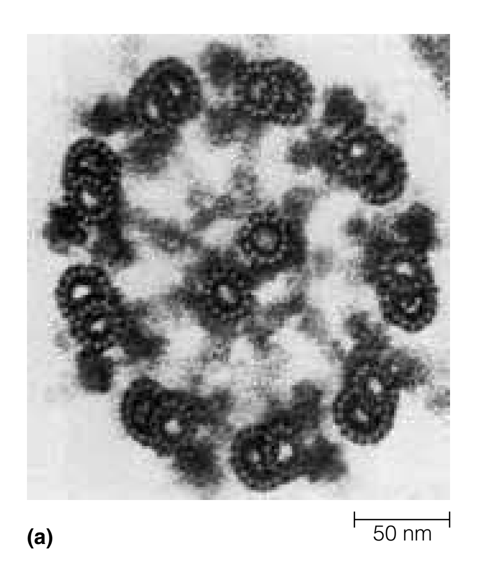
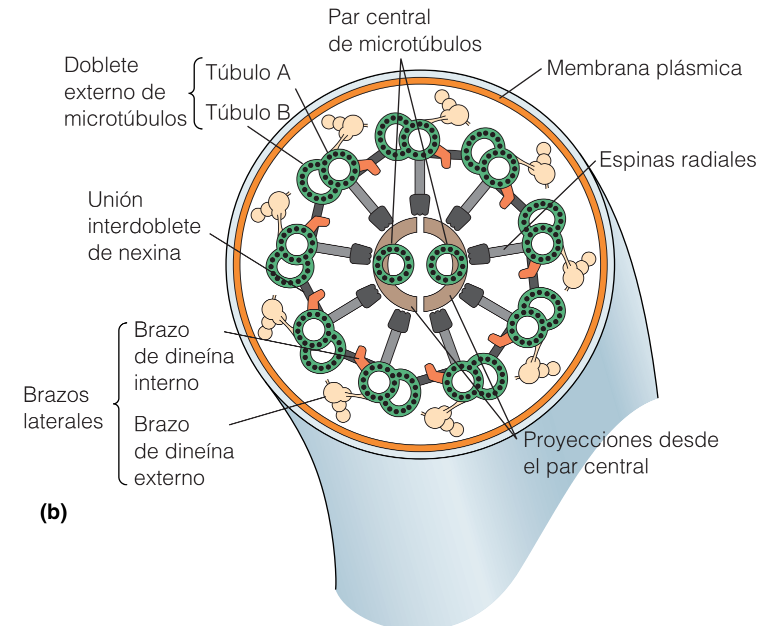


Figura 16.7 Estructura de un cilio. (**a**) En estas secciones longitudinales de tres cilios del protozoo *Tetrahymena thermophila* se pueden observar varios de sus componentes, como el par central, los dobletes externos de microtúbulos y los radios. Se muestran los cortes transversales de (**b**) axonemas, (**c**) zona de transición entre los cilios y los corpúsculos basales, y (**d**) corpúsculos basales. Obsérvese el patrón de tripletes del corpúsculo basal y el patrón 9 + 2 de la disposición de microtúbulos en el axonema del cilio (todos SEMs).

El axonema tiene una disposición característica conocida como «9 + 2», con nueve **dobletes de túbulos externos** y dos microtúbulos adicionales en el centro, conocidos habitualmente como **par central**. La Figura 16.8 ilustra con más detalle estas características estructurales. Se piensa que los nueve dobletes externos del axonema son extensiones de dos de los túbulos que forman cada uno de los nueve tripletes del corpúsculo basal. Cada doblete del axonema está por tanto constituido por un MT completo, denominado el **túbulo A,** y un MT incompleto, el **túbulo B** (Figura 16.8b). El túbulo A tiene 13 protofilamentos, mientras que el túbulo B tiene sólo 10 u 11. Los dos túbu-





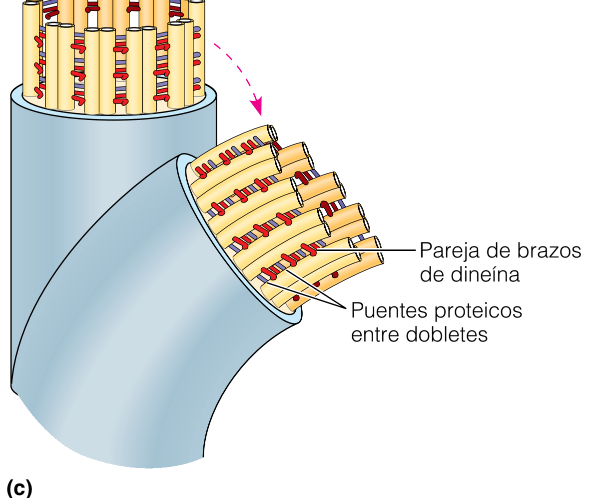


Figura 16.8 Detalles del axonema. (**a**) En esta micrografía se muestra el axonema de un flagelo de *Chlamydomonas* (TEM). (**b**)Esquema de un axonema cortado transversalmente. Los microtúbulos del par central, así como los túbulos de los dobletes externos, tienen 13 protofilamentos cada uno. Cada túbulo B presenta 11 protofilamentos propios y comparte 5 protofilamentos con el túbulo A. Los brazos de dineína poseen actividad ATP-asa y se cree que son los responsables del deslizamiento de dobletes adyacentes. Las uniones interdobletes (conexiones de nexina) unen dobletes adyacentes y las espinas radiales se proyectan hacia dentro, para terminar cerca de las proyecciones que se extienden hacia fuera desde el par central de MTs. (**c**) Incurvamiento del axonema por la dineína. La unión de los MTs de los dobletes externos al par central transforma el deslizamiento de MTs adyacentes en un incurvamiento local del axonema.

los del par central son completos, con 13 protofilamentos cada uno. Todas estas estructuras contienen tubulina y una segunda proteína denominada *tectina.* La tectina está relacionada con las proteínas de los filamentos intermedios (*véase* Capítulo 15) y es un componente imprescindible del axonema. Los túbulos A y B comparten una pared que presuntamente tiene como principal componente la tectina.

El axonema posee otras estructuras relevantes además de los microtúbulos (Figura 16.8b). Entre éstas, destacan por su importancia un conjunto de **brazos exteriores** que se proyectan hacia fuera desde cada uno de los túbulos A de los nueve dobletes externos. Cada brazo exterior se proyecta en sentido horario hacia el túbulo B del doblete adyacente. Estos brazos están formados por dineína, que es la encargada de deslizar los MTs unos sobre otros para doblar el axonema. Existen dos brazos de dineína, un brazo interior y otro exterior, que se encuentran dispuestos a intervalos regulares a lo largo del MT. Los dobletes adyacentes están unidos a intervalos menos fecuentes por **uniones interdoblete.** Se cree que estas uniones limitan la distancia que un doblete puede desplazarse con respecto a otro cuando el axonema se curva.

También a intervalos regulares, existen **espinas radiales** que se proyectan hacia el interior desde cada uno de los nueve dobletes de MT y que acaban cerca de un conjunto de proyecciones que se extienden desde el exterior del par central de microtúbulos. Se piensa que estas espinas desempeñan una labor importante en la transformación del movimiento deslizante de dobletes adyacentes en el incurvamiento que caracteriza el batido de estos apéndices. Aparte de la unión de las espinas radiales al par central, una proteína denominada **nexina** une los dobletes adyacentes entre sí y probablemente participan también en la conversión del deslizamiento en el incurvamiento del apéndice.

El deslizamiento de los microtúbulos en el axonema provoca que los cilios y los flagelos se doblen

¿Cómo funciona la dineína en esta estructura tan elaborada para generar el incurvamiento de los cilios y los flagelos? La longitud total de los MTs de los cilios y los flagelos no varía. En vez de eso, los microtúbulos de dobletes adyacentes se deslizan uno sobre otro, consumiendo ATP. Según el **modelo de deslizamiento de microtúbulos** de cilios y flagelos, este deslizamiento produce un incurvamiento localizado debido a que los dobletes del axonema están conectados radialmente al par central y circunferencialmente entre sí, y por lo tanto no pueden deslizarse libremente uno sobre otro. Como resultado de este incurvamiento, se obtiene un movimiento parecido a una onda que comienza en la base del orgánulo y se propaga hasta la punta.

Los brazos de dineína son los responsables del deslizamiento. La fuerza motriz para el deslizamiento de los MTs la proporciona la hidrólisis del ATP, catalizada por la actividad ATPasa de los brazos de dineína. La importancia de éstos se demuestra por dos tipos de evidencias. En primer lugar, cuando se extrae selectivamente la dineína de axonemas aislados, los brazos entre los dobletes externos desaparecen y el axonema pierde, tanto su capacidad de hidrolizar ATP, como de batimiento. Es más, este efecto es reversible: si se añade dineína purificada a los dobletes externos aislados, los brazos vuelven a aparecer y se restaura el deslizamiento dependiente de ATP.

Una segunda prueba proviene del estudio de mutantes no móviles en especies que normalmente lo son, como el alga verde *Chlamydomonas*. Algunos de los mutantes presentan flagelos, pero éstos no son funcionales. Dependiendo de la mutación en particular, sus flagelos no móviles carecen de los brazos de dineína, las espinas radiales o el par central de microtúbulos. Por lo tanto, estas estructuras son seguramente imprescindibles en el mecanismo del movimiento.

La dineína del axonema es una proteína muy grande. Tiene múltiples subunidades, las tres mayores actividad ATPasa y un peso molecular de 450.000 cada una. Durante el proceso de deslizamiento, aparentemente el tallo del brazo de la dineína se une y se desune cíclicamente al túbulo B. Cada ciclo requiere la hidrólisis de ATP y desplaza el brazo de dineína de un doblete hacia el doblete adyacente. De esta manera, se produce un movimiento relativo de un doblete respecto al doblete adyacente.

Los puentes cruzados y las espinas son los responsables del incurvamiento. Para convertir el desplazamiento de dobletes generado por la dineína en un movimiento ondulatorio, los dobletes deben estar sujetos de tal manera que resistan el deslizamiento pero permitan la deformación. Esta resistencia la proporcionan las espinas radiales que conectan los dobletes al par central de microtúbulos y posiblemente también por los puentes de nexina entre los dobletes (Figura 16.8b y c). Si se eliminan estos puentes y espinas (por ejemplo, mediante la digestión con enzimas proteolíticas), desaparece la resistencia que transforma el deslizamiento en incurvamiento. En estas condiciones, los dobletes están libres y se mueven los unos respecto a los otros, y los axonemas se alargan y adelgazan a medida que se deslizan los MTs.

Además de su función en el batido de cilios y flagelos, la dineína del axonema y las espinas radiales participan en un proceso que a primera vista parece no tener nada que ver con su función de deslizar microtúbulos: la disposición de los órganos internos del organismo (*véase* el Anexo 16A).

El transporte intraflagelar añade componentes a los flagelos en crecimiento. La complicada estructura de los cilios y los flagelos plantea una interesante cuestión: ¿Cómo se incorporan las subunidades de tubulina y otros componentes a los cilios y los flagelos en crecimiento? El análisis de mutantes de *Chlamydomonas* y de nematodos reveló que existen, tanto motores de movimiento hacia el extremo *más*, como hacia el extremo *menos*, y que transportan componentes hacia y desde los extremos de los flagelos. Este proceso, conocido como **transporte intraflagelar** (en el caso de los flagelos), es en cierta medida similar al proceso de transporte axonal en las células nerviosas. Una quinesina parece transportar el material hacia el extremo del flagelo, y una dineína lleva el material de vuelta a la base del flagelo.

Movimientos celulares dependientes de actina: las miosinas

Las miosinas desempeñan diferentes funciones en la motilidad celular

El principal sistema de filamentos de la célula, el citoesqueleto de actina es también capaz de desplazar moléculas y otros componentes celulares. Al igual que sucede con los microtúbulos, las mecanoenzimas funcionan como motores dependientes de ATP, que ejercen tensión sobre los microfilamentos de actina en la célula. Estas mecanoenzimas pertenecen a una gran superfamilia de proteínas, conocidas como **miosinas**. Actualmente, se conocen al menos 18 clases de miosinas. Todas las miosinas tienen como mínimo una cadena polipeptídica, denominada *cadena pesada*, con una cabeza globular en un extremo unida a una cola de longitud variable (Figura 16.9). La cabeza globular se une a la actina y utiliza la energía de la hidrólisis del ATP para desplazarse a lo largo del filamento de actina. La estructura de la cola varía en los diferentes tipos de miosinas, confiriendo a éstas la capacidad de unirse a diferentes moléculas o estructuras celulares. Además, la cola también po-

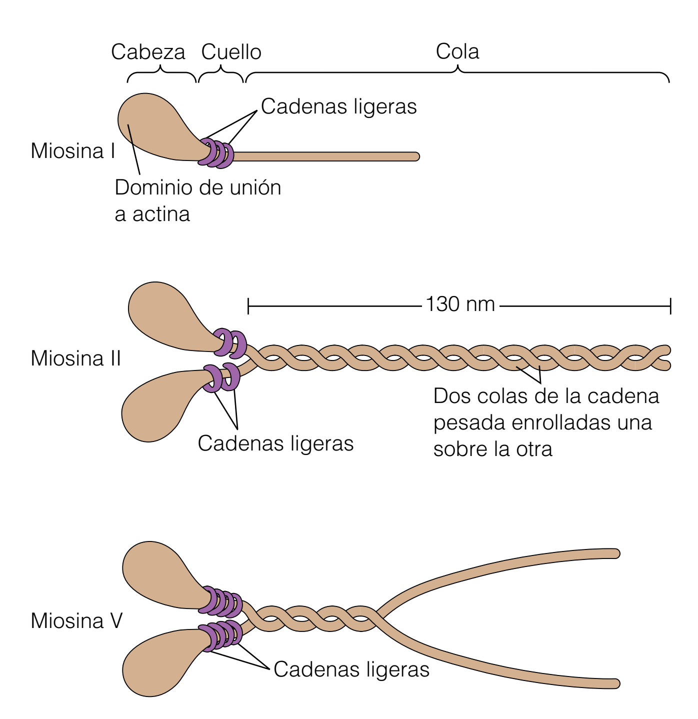


Figura 16.9 **Miembros de la familia de la miosina.** Todas las miosinas tienen una «cabeza» formada por una cadena pesada que se une a la actina y al ATP, y dos o más cadenas ligeras reguladoras. Ciertas miosinas, como la miosina I, tienen sólo una cabeza. Otras, como la miosina II y la miosina V, se asocian a través de sus colas formando proteínas con dos cabezas.

sibilita la unión entre varias miosinas iguales formando dímeros o polímeros. Normalmente las miosinas contienen pequeños polipéptidos unidos a las cabezas globulares. Estos polipéptidos, conocidos como *cadenas ligeras*, desempeñan frecuentemente un papel en la regulación de la actividad ATPasa de la miosina. Algunas miosinas poco comunes presentan un sitio de unión a actina tanto en la cola como en la cabeza globular. Otras, como la miosina I y la miosina V, parecen unirse a membranas, lo que sugiere que pueden intervenir en el movimiento de la membrana plasmática o en el transporte de orgánulos de membrana dentro de la célula.

Se ha demostrado que las miosinas intervienen en procesos tan generales como la contracción muscular, el movimiento celular y la fagocitosis. Por ejemplo, en algunos experimentos con ratones mutantes, se demuestra el requerimiento de una miosina V para la transferencia de gránulos de pigmento desde los melanocitos (células que producen el pigmento) a los queratinocitos (células del pelo que toman el pigmento). También parece ser necesaria una miosina V para el correcto posicionamiento del retículo endoplásmico liso en las células nerviosas, lo que sugiere que participa en el transporte de vesículas u otros procesos relacionados con las membranas. Recientemente se ha descubierto que una enfermedad en el ser humano conocida como *enfermedad de Griscelli*, que cursa con un albinismo parcial y déficit neurológicos, es el resultado de una mutación en la misma clase de miosina. Una función inesperada de varias clases de miosinas es la del mantenimiento de estructuras necesarias para la audición en el ser humano (*véase* Anexo 16A).

Las miosinas mejor conocidas son las **miosinas de tipo II**. Están formadas por dos cadenas pesadas, cada una con una cabeza globular de miosina, una región bisagra, una larga cola en forma de bastón y cuatro cadenas ligeras. Estas miosinas se encuentran en las células del músculo liso, del músculo cardíaco y del esquelético, al igual que en células no musculares. Las miosinas de tipo II tienen la característica de que pueden juntarse para formar filamentos largos como los filamentos gruesos de las células musculares. La función primordial de las miosinas de tipo II en todos los tipos celulares es transformar la energía del ATP en fuerza mecánica que provoque el deslizamiento de los filamentos de actina sobre las moléculas de miosina, produciéndose así la contracción de la célula. Por ejemplo, en los embriones de *Drosophila*, hay un tipo de miosina II no muscular que se localiza en los extremos libres de una lámina de células epiteliales que se cierra tomando la forma de la correa de un bolso. El análisis de mutantes en los que no existe la miosina o es defectuosa, indican que ésta es necesaria para el cierre de la lámina. La miosina II permitiría la contracción del extremo libre de la lámina gracias al deslizamiento de los microfilamentos de actina en dicho extremo. En diversos estudios desarrollados en hongos que habitan en el cieno, se ha mostrado que las miosinas de tipo II participan también en el estrangulamiento del anillo contráctil durante la citoquinesis.

Algunas miosinas se mueven a pasos cortos a lo largo de los filamentos de actina

Al igual que las quinesinas, el estudio de las miosinas se ha llevado a cabo en el nivel molecular. Se han usado varias técnicas para dilucidar cómo las cabezas de miosinas se mueven a lo largo de los filamentos de actina y cuánta fuerza puede generar una única molécula de miosina. Todo esto surge de la observación de que las miosinas se mueven in vitro a lo largo de los filamentos de actina en presencia de ATP. Estas técnicas han mostrado que la fuerza que ejercen las cabezas de miosina sobre la actina es similar a la que se estimó para la quinesina. La distancia media que una miosina II puede deslizarse sobre un filamento de actina es de 12-15 nm. Al igual que la quinesina, la miosina II es un motor eficaz; cuando las miosinas traccionan de cargas moderadas, presentan una eficacia de aproximadamente el 50%.

Es útil comparar las dos tipos de motores proteicos citoesqueléticos mejor estudiados, la quinesina «clásica» y la miosina II, porque nos permite conocer cómo funcionan los motores bioquímicos en el nivel molecular. Los dos tie-

Proteínas motoras del citoesqueleto y enfermedades humanas

Conforme se ha ido facilitando la identificación de los genes defectuosos en muchas enfermedades genéticas del ser humano, los investigadores han caracterizado varias patologías provocadas por defectos en las proteínas motoras. Trataremos dos ejemplos: la inversión de la simetría corporal y la sordera genética.

Dineínas del axonema y espinas radiales y la inversión del eje corporal izquierda-derecha

En al menos 1 de cada 20.000 nacimientos en el ser humano, los órganos en la cavidad corporal están intercambiados de izquierda a derecha. Este hecho, conocido como *situs inversum viscerum*, no tiene consecuencias médicas y muchas veces pasa inadvertido hasta que el paciente se somete a una revisión médica por otras causas, momento en el cual se reconoce la localización invertida. Por otra parte, cuando sólo alguno de los órganos está invertido (*heterotaxia*), se producen serias complicaciones de la salud. Los pacientes que sufren una enfermedad autosómica recesiva conocida como la *tríada de Kartagener*, tienen un 50% de probabilidades de tener los órganos internos completamente intercambiados de izquierda a derecha. Además, estos pacientes sufren esterilidad masculina y problemas bronquiales. La causa de estas anormalidades se encuentra en los brazos externos de la dineína de los cilios y los flagelos. En estudios recientes basados en ratones mutantes, se ha comprobado que las proteínas motoras de los microtúbulos están de alguna manera implicadas en la asimetría bilateral, durante el desarrollo embrionario de los mamíferos. En los mutantes *inversum viscerum (iv)*, los órganos internos están invertidos en la mitad de los homocigotos recién nacidos. Sorprendentemente, *iv* codifica para la dineína del axonema. Actualmente se están llevando a cabo investigaciones para clarificar los mecanismos subyacentes a la inversión del eje izquierda-derecha en estos mutantes.

Miosinas y sordera

Recientemente, se ha relacionado a las miosinas no musculares con alteraciones genéticas humanas. Por ejemplo, la mutación en una miosina VII provoca el *síndrome de Usher*, una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por la pérdida profunda congénita de la audición, problemas en el sistema vestibular (es decir, en la sensación de dónde está uno en el espacio) y *retinitis pigmentosum*, que produce ceguera. En el oído interno, las células especializadas conocidas como *células pilosas,* tienen estructuras sensoriales ricas en actina denominadas *estereocilios* (Figura 16A.1). Las células pilosas llevan a cabo la transducción auditiva y vestibular. El soma y los estereocilios de la célula pilosa presentan una gran concentración de un tipo de miosina VII. También se expresa una miosina VII en el epitelio pigmentado de la retina y en los fotorreceptores del ojo, un fenómeno que concuerda con su posible función asociada a la visión. Se están llevando a cabo investigaciones que buscan dilucidar la función específica de la miosina VII en estos procesos.

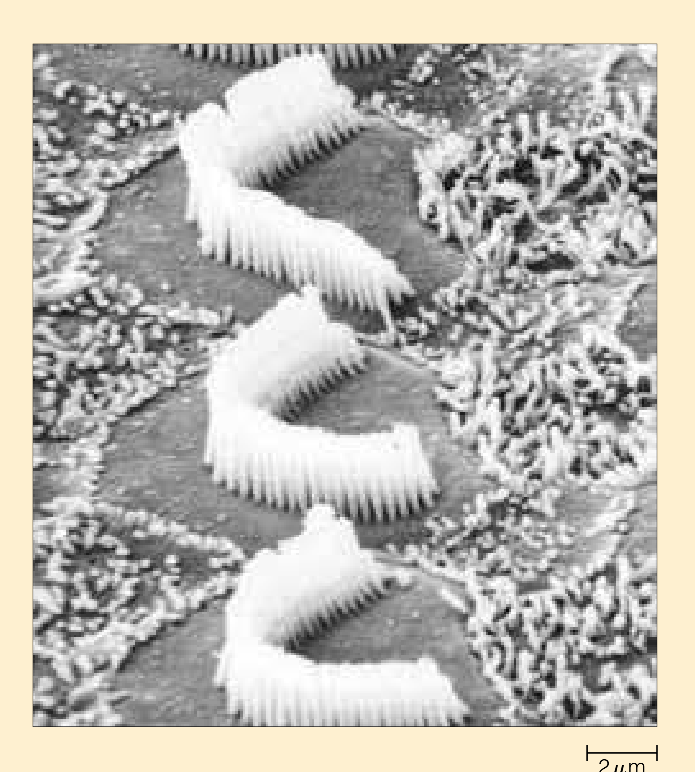


Figura 16A.1 Micrografía electrónica de barrido de las células epiteliales del oído interno que muestra varias filas de estereocilios. Los estereocilios son parecidos a las microvellosidades, si bien mucho más grandes. Perciben movimientos leves producidos por las vibraciones sonoras o por el movimiento del fluido de los canales semicirculares (Dr. Richard Kessel & Dr. Gene Shih/Visuals Unlimited).

nen dos cabezas que usan para «caminar» a lo largo del filamento proteico, y ambos se valen de la hidrólisis del ATP para cambiar su forma. No obstante y a pesar de estas similitudes, también presentan profundas diferencias. Las quinesinas convencionales trabajan solas o en pequeños grupos para transportar vesículas a largas distancias; una única quinesina puede moverse cientos de nanómetros a lo largo de un microtúbulo. Por su parte, una única molécula de miosina II no puede desplazarse sobre el filamento de actina una distancia superior a la que se encuentre su próximo sitio de unión. A cambio, las moléculas de miosina II pueden trabajar formando grupos grandes. En el

caso de los filamentos de miosina del músculo, los grupos pueden contener billones de motores trabajando conjuntamente. La primera miosina convencional identificada, fue una de estas que operan formando grandes grupos y es una de las mejor caracterizadas. Hablamos de la miosina II implicada en la contracción muscular, que trataremos a continuación.

Movimiento basado en los filamentos: el músculo

La **contracción muscular** es el ejemplo de trabajo mecánico mediado por filamentos intracelulares más conocido. Los mamíferos cuentan con varios tipos de músculos, como el cardíaco, el esquelético y el liso. Trataremos en primer lugar el músculo esquelético, ya que gran parte del conocimiento que poseemos del proceso contráctil se obtuvo de las primeras investigaciones de su estructura molecular y de su función.

Las células del músculo esquelético están formadas por filamentos finos y gruesos

Los **músculos esqueléticos** son los responsables del movimiento voluntario. La Figura 16.10 muestra la organización estructural del músculo esquelético. Un músculo está formado por haces de **fibras musculares** paralelas que se unen mediante tendones al hueso que el músculo debe mover. Cada fibra es, de hecho, una larga y fina célula multinucleada, que está altamente especializada para su función contráctil. La fusión de células embrionarias denominadas *mioblastos* durante la diferenciación del músculo, produce estas células multinucleadas. Dicha fusión celular es también responsable, al menos en parte, de la sorprendente longitud de las células musculares, que pueden llegar a alcanzar varios centrímetros.

En el nivel subcelular, cada fibra muscular (o célula) contiene numerosas **miofibrillas**. Las miofibrillas tienen un diámetro de 1-2 μm y pueden abarcar a la célula entera en longitud. Cada miofibrilla está subdividida a su vez en unidades que se repiten y que se denominan **sarcómeros.**

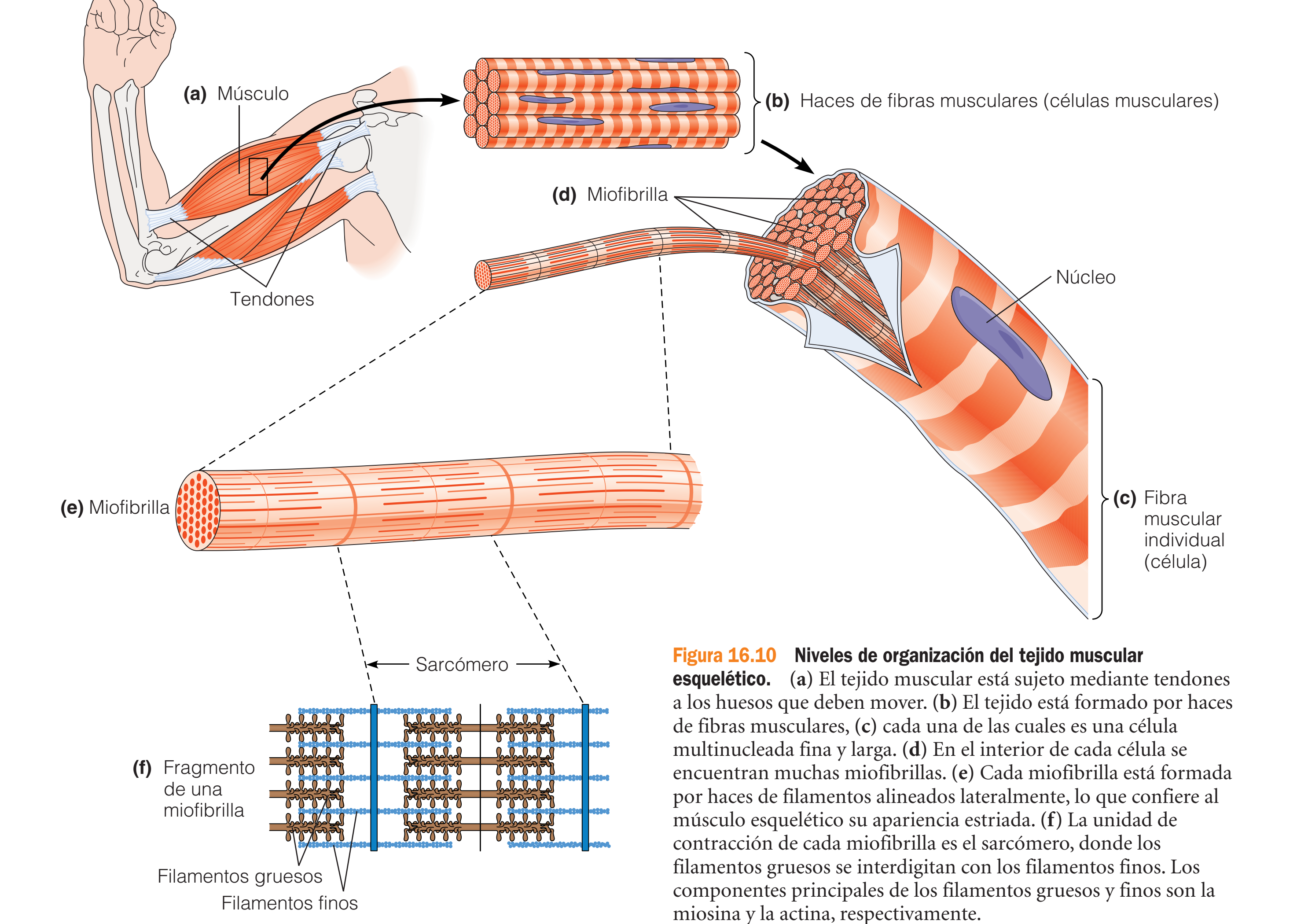


Figura 16.10 Niveles de organización del tejido muscular esquelético. (**a**) El tejido muscular está sujeto mediante tendones a los huesos que deben mover. (**b**) El tejido está formado por haces de fibras musculares, (**c**) cada una de las cuales es una célula multinucleada fina y larga. (**d**) En el interior de cada célula se encuentran muchas miofibrillas. (**e**) Cada miofibrilla está formada por haces de filamentos alineados lateralmente, lo que confiere al músculo esquelético su apariencia estriada. (**f**) La unidad de contracción de cada miofibrilla es el sarcómero, donde los filamentos gruesos se interdigitan con los filamentos finos. Los componentes principales de los filamentos gruesos y finos son la miosina y la actina, respectivamente.

El sarcómero es la unidad contráctil elemental de la célula muscular. Cada sarcómero posee haces de **filamentos gruesos** y de **filamentos finos.** Los filamentos gruesos están formados por miosina, mientras que los filamentos finos están formados básicamente por actina, aunque también están presentes otras proteínas importantes. Los filamentos finos están organizados alrededor de los filamentos gruesos siguiendo un patrón hexagonal, como puede observarse en el corte transversal de una miofibrilla (Figura 16.11).

Los filamentos en el músculo esquelético están alineados lateralmente, confiriendo a las miofibrillas un patrón alterno de bandas oscuras y claras. Este patrón de bandas, o *estrías*, es característico del músculo esquelético y del cardíaco, y es por esta razón por la que se les clasifica como **músculos estriados**. Las bandas oscuras se denominan **bandas A**, y las bandas claras **bandas I** (la terminología de la estructura y la apariencia de las miofibrillas musculares se estableció a partir de observaciones hechas con el microscopio de luz polarizada. I viene de *isótropa* y A de *anisótropa*, refiriéndose ambos términos a la apariencia de estas bandas cuando son iluminadas con luz polarizada).

Como se ilustra en la Figura 16.12b, la región más clara en la mitad de cada banda A se denomina **zona H** (de la palabra alemana *hell*, que significa «claro»). Recorriendo el centro de la zona H se encuentra la **línea M**, que contiene *miomesina*, una proteína que mantiene unidos entre sí a los filamentos de miosina. En la mitad de cada banda I se observa una línea densa, el disco Z (de la palabra alemana *zwischen*, que significa «entre»). La distancia entre un disco Z y el siguiente determina la longitud de un sarcómero. Un sarcómero mide 2,5-3,0 μm en el estado relajado, pero esta longitud se hace más pequeña a medida que el músculo se contrae.

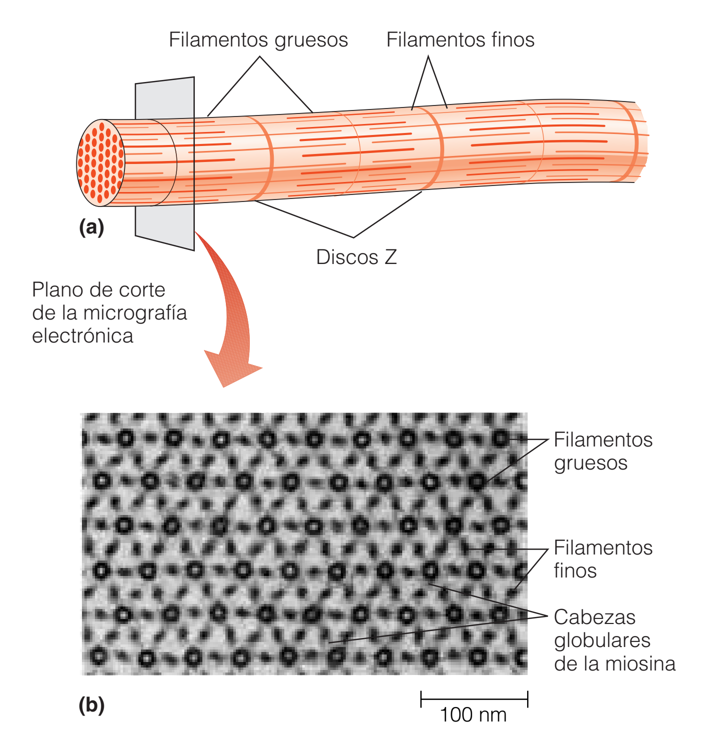


Figura 16.11 Distribución de filamentos finos y gruesos en una miofibrilla. (**a**) Una miofibrilla está formada por filamentos finos y gruesos interdigitados. (**b**) Los filamentos finos se organizan alrededor de los filamentos gruesos siguiendo un patrón hexagonal, como se puede observar en un corte transversal del músculo del vuelo de la mosca de la fruta *Drosophila Melanogaster*, visto mediante microscopía electrónica de alto voltaje (HVEM).

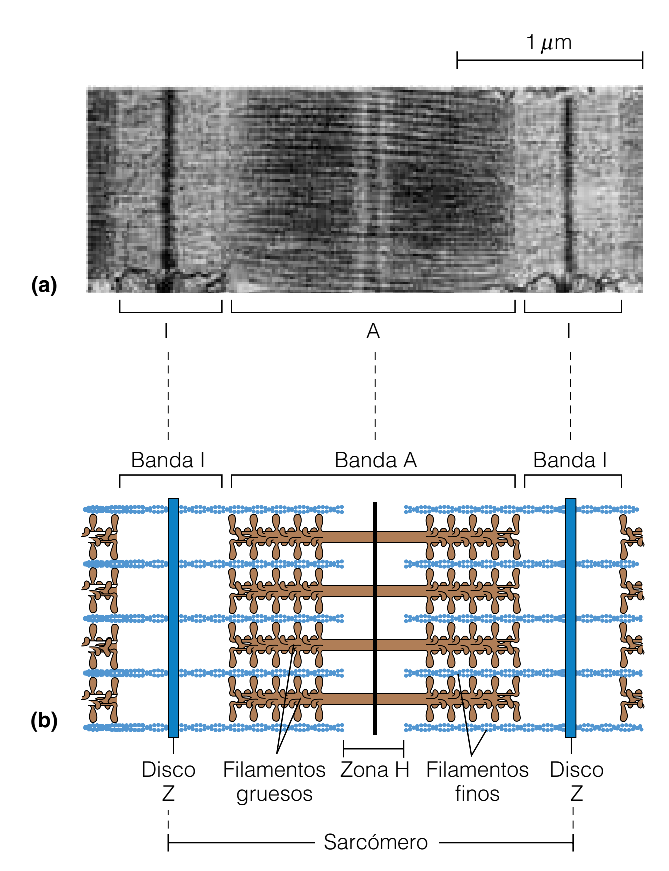


Figura 16.12 Apariencia y nomenclatura del músculo esquelético. (**a**) Micrografía electrónica de un único sarcómero (TEM). (**b**) Esquema que ayuda a interpretar el patrón de bandas en el músculo esquelético en función de la interdigitación de filamentos finos y gruesos. Una banda A se corresponde con la longitud de los filamentos gruesos, y una banda I abarca la parte de los filamentos finos que no se superponen a los filamentos gruesos. La zona más clara en el centro de la banda A se denomina zona H, la línea que se encuentra en el centro de ésta, se conoce como línea M. La zona densa en el centro de cada banda I se denomina disco Z. Un sarcómero, la unidad básica que se repite a lo largo de la miofibrilla, es la distancia entre dos discos Z consecutivos.

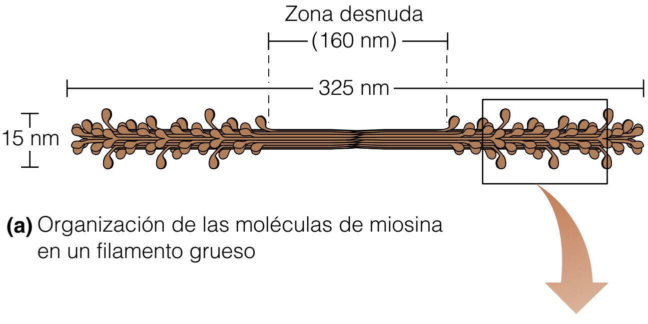
Los sarcómeros están formados por grupos ordenados de actina, miosina y proteínas accesorias

El patrón estríado del músculo esquelético y el acortamiento de los sarcómeros durante la contracción se puede explicar atendiendo a los filamentos gruesos y finos que conforman las miofibrillas. Por esta razón, analizaremos

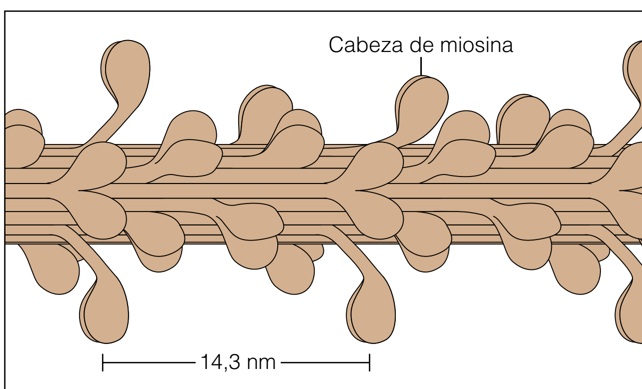
con detalle ambos tipos de filamentos y después volveremos al proceso de la contracción muscular, en los que ambos filamentos desempeñan un papel crucial.

Filamentos gruesos. Los filamentos gruesos de las miofibrillas tienen un diámetro de 15 nm y una longitud aproximada de 1,6 μm. Se sitúan paralelos unos a otros en la mitad del sarcómero (*véase* Figura 16.12). Cada filamento grueso está formado por multitud de moléculas de miosina, que se orientan de manera opuesta en las dos mitades del filamento. Las moléculas de miosina son largas y finas y presentan un peso molecular aproximado de 510 kDa.

Cada filamento grueso está constituido por cientos de moléculas de miosina agrupadas de manera escalonada, de tal manera que sus cabezas se proyectan hacia el exterior del filamento, siguiendo un patrón repetido (Figura 16.13). Los pares de cabezas se distancian entre sí 14,3 nm a lo largo del filamento grueso, con un desplazamiento de un tercio del diámetro del filamento con respecto al anterior par de cabezas. Estas protrusiones pueden contactar con los filamentos finos adyacentes, formándose así puentes entre los filamentos gruesos y los finos, que son esenciales en el mecanismo de la contracción muscular.



(a) Organización de las moléculas de miosina en un filamento grueso



(b) Fragmento de un filamento grueso

Figura 16.13 El filamento grueso del músculo esquelético. (**a**) El filamento grueso de la miofibrilla está formado por cientos de moléculas de miosina organizadas de manera escalonada y repetitiva. Un filamento grueso típico mide alrededor de 1,6 μm de longitud y tiene un diámetro de 15 nm. Las moléculas de miosina individuales están integradas longitudinalmente en el filamento, con sus cabezas con actividad ATPasa orientadas hacia el exterior. La región central del filamento es, por tanto, una zona desnuda que no tiene cabezas. (**b**) Esta magnificación de una parte del filamento grueso muestra que los pares de cabezas de miosina están separados 14,3 nm.

Filamentos finos. Los filamentos finos se interdigitan con los filamentos gruesos. Los filamentos finos tienen un diámetro de 7 nm y una longitud aproximada de 1 μm y son los únicos filamentos que se encuentran en las bandas I de la miofibrilla. De hecho, cada banda I contiene *dos* series de filamentos finos, una a cada lado del disco Z, que se extienden hacia la banda A del centro del sarcómero hasta introducirse en ella. Todo esto hace que la longitud de las bandas I sea de casi 2 μm en un músculo distendido.

La estructura de los filamentos finos se muestra en la Figura 16.14. El filamento fino está constituido por al menos tres proteínas. La más importante de ellas es la actina. Recuerde del Capítulo 15, que la actina se sintetiza como actina G, pero polimeriza en cadenas lineales largas de actina F. Los filamentos finos son cadenas lineales de actina F entretejidas con las proteínas **tropomiosina** y **troponina**. La tropomiosina es una molécula larga con forma de bastón, similar a la cola de miosina, que encaja en el hueco de la hélice de actina. Cada molécula de tropomiosina se extiende aproximadamente 38,5 nm a lo largo del filamento y se asocia a lo largo de su longitud con siete monómeros de actina.

La troponina es en realidad un complejo formado por tres cadenas polipeptídicas, llamadas *TnT*, *TnC* y *TnI*. La TnT se une a la tropomiosina y se cree que es responsable de la posición del complejo sobre la molécula de tropomiosina. La TnC liga iones de calcio, y la TnI se une a la actina. (Tn hace referencia a troponina, T a tropomiosina, C a calcio, e I a inhibitora, porque TnI inhibe la contracción muscular.) Cada tropomiosina tiene asociado un complejo de troponina, por lo que el espacio entre troponinas consecutivas a lo largo del filamento fino es de 38,5 nm. La

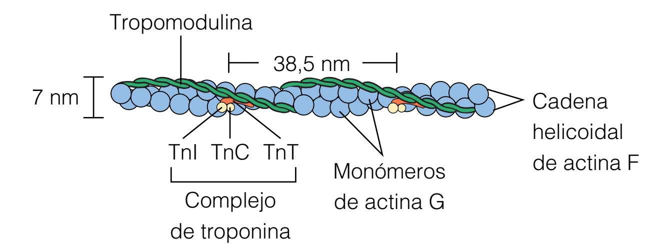


Figura 16.14 El filamento fino del músculo estriado. Cada filamento fino es una cadena única de actina F en la que los monómeros de actina G están escalonados y parecen formar una hélice de dos cadenas. Una consecuencia de esta organización es que se forman dos huecos a ambos lados del filamento. Las moléculas con forma de cinta de la tropomiosina, se encuentran en dichas cavidades. Cada molécula de tropomiosina está formada por dos hélices α unidas una a la otra que forman una cinta con un diámetro de aproximadamente 2 nm y una longitud de 38,5 nm. Cada molécula de tropomiosina lleva asociado un complejo de troponina, que está formado por tres polipéptidos TnT, TnC y TnI.

troponina y la tropomiosina constituyen un interruptor sensible al calcio, que activa la contracción, tanto en el músculo esquelético como en el cardíaco.

Organización de los filamentos musculares. ¿Cómo es posible que los filamentos proteicos de las fibras musculares mantengan una organización tan precisa, cuando los microfilamentos en otras células están relativamente desorganizados? La respuesta está en ciertas proteínas estructurales que desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de la arquitectura de las proteínas musculares (Figura 16.15). Por ejemplo, la α-*actinina* mantiene los filamentos de actina organizados en haces paralelos y, junto con la proteína casquete *CapZ*, mantiene el anclaje de los extremos barbados (*más*) de los filamentos de actina al disco Z. En el otro extremo de los filamentos finos se encuentra la *tropomodulina*, que ayuda a mantener la longitud y la estabilidad de los filamentos finos uniéndose a sus extremos apuntados (*menos*). La *miomesina* se localiza en los filamentos gruesos de la zona H y une las moléculas de miosina formando los haces. Una tercera proteína estructural, la *titina*, sujeta los filamentos gruesos a los discos Z. La titina es muy flexible; durante los ciclos de contracción-relajación, es capaz de mantener correctamente la posición de los filamentos gruesos con respecto a los filamentos finos. Otra proteína, la *nebulina*, estabiliza la organización de los filamentos finos. La Tabla 16.2 recoge las proteínas que participan en la contracción muscular. El proceso contráctil surge de la interacción de todas estas proteínas.

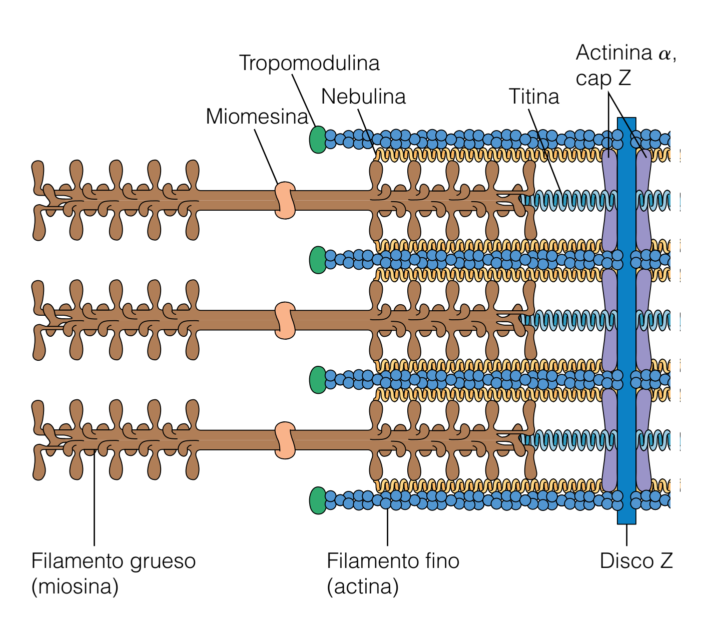


Figura 16.15 Proteínas estructurales del sarcómero. Los filamentos gruesos y finos necesitan un soporte estructural para mantener su organización exacta en el sarcómero. Dicho soporte lo proporcionan dos proteínas actinina α y miomesina, que anclan los filamentos de actina y miosina, respectivamente. La titina une los filamentos gruesos al disco Z, conservando de esta manera su posición respecto al conjunto de filamentos finos. La nebulina estabiliza el anclaje de los filamentos finos al disco Z.

El modelo de deslizamiento de filamentos explica la contracción muscular

Con lo que sabemos sobre la estructura del músculo, estamos ya capacitados para ver qué sucede durante la contracción muscular. Gracias a estudios de microscopía electrónica, se sabe que las bandas A de las miofibrillas no varían su longitud durante la contracción, mientras que las bandas I se acortan progresivamente y desaparecen casi por completo en el estado de contracción máxima. Para explicar estas observaciones, se propuso el modelo de deslizamiento de filamentos. En la Figura 16.16 se ilustra este

Tabla 16.2 Funciones de las proteínas

Proteína	Peso molecular (kDa)	Función
Actina	42	Componente principal de los filamentos finos
Miosina	510	Componente principal de los filamentos gruesos
Tropomiosina	64	Se une a los filamentos finos en toda su longitud
Troponina	78	Localizada a intervalos regulares a lo largo de los filamentos finos; interviene en la regulación de la contracción mediada por el calcio
Titina	2.500	Une los filamentos gruesos al disco Z
Nebulina	700	Une los filamentos finos al disco Z
Miomesina	185	Proteína que se une a la miosina localizada en la línea M de los filamentos gruesos
Actinina α	190	Mantiene unidos los filamentos de actina formando un haz y los une al disco Z
Ca^{2+} ATP asa	115	Proteína principal del retículo sarcoplásmico (SR); transporta el Ca^{2+} al interior del SR para relajar el músculo
CapZ	68	Une los filamentos de actina al disco Z
Tropomodulina	41	Mantiene la longitud y la estabilidad de los filamentos finos

modelo, que fue propuesto de manera independiente por Andrew Huxley y Rolf Niedergerke y por Hugh Huxley y Jean Hanson en 1954. Según este modelo, la contracción muscular se produce por el deslizamiento de los filamentos finos sobre los filamentos gruesos, sin que exista ningún cambio en la longitud de ambos filamentos. El modelo de deslizamiento no sólo resultó ser cierto, sino que fue de gran utilidad para centrar la atención sobre las interacciones moleculares entre los filamentos gruesos y los finos, que subyacen al proceso de deslizamiento.

Como se observa en la Figura 16.16a, la contracción supone el deslizamiento de los filamentos finos de manera que son atraídos progresivamente hacia los espacios que existen entre filamentos gruesos adyacentes, y se produce un estrechamiento de las bandas I. El resultado es un acortamiento de los sarcómeros y de las miofibrillas y, por lo tanto, una contracción de la célula muscular y del tejido en su totalidad. Esto, a su vez, produce el movimiento de las partes del cuerpo sujetas a ese músculo.

La interdigitación y el deslizamiento de los filamentos finos sobre los gruesos como forma de generar una fuerza, sugiere que debe existir una relación entre la fuerza generada durante la contracción y el grado de acortamiento del sarcómero. De hecho, cuando se mide la relación entre el acortamiento y la fuerza, el resultado es exactamente el que predice el modelo (Figura 16.16b): la cantidad de fuerza que un músculo puede generar durante la contracción depende del número de cabezas de miosina del filamento grueso que pueden contactar con el filamento fino. Cuando el sarcómero está estirado, existe relativamente poca superposición entre los filamentos gruesos y los finos, por lo que la fuerza generada es pequeña. A medida que el sarcómero se acorta, la zona de superposición se incrementa y la fuerza de contracción es, por consiguiente, mayor. Final-

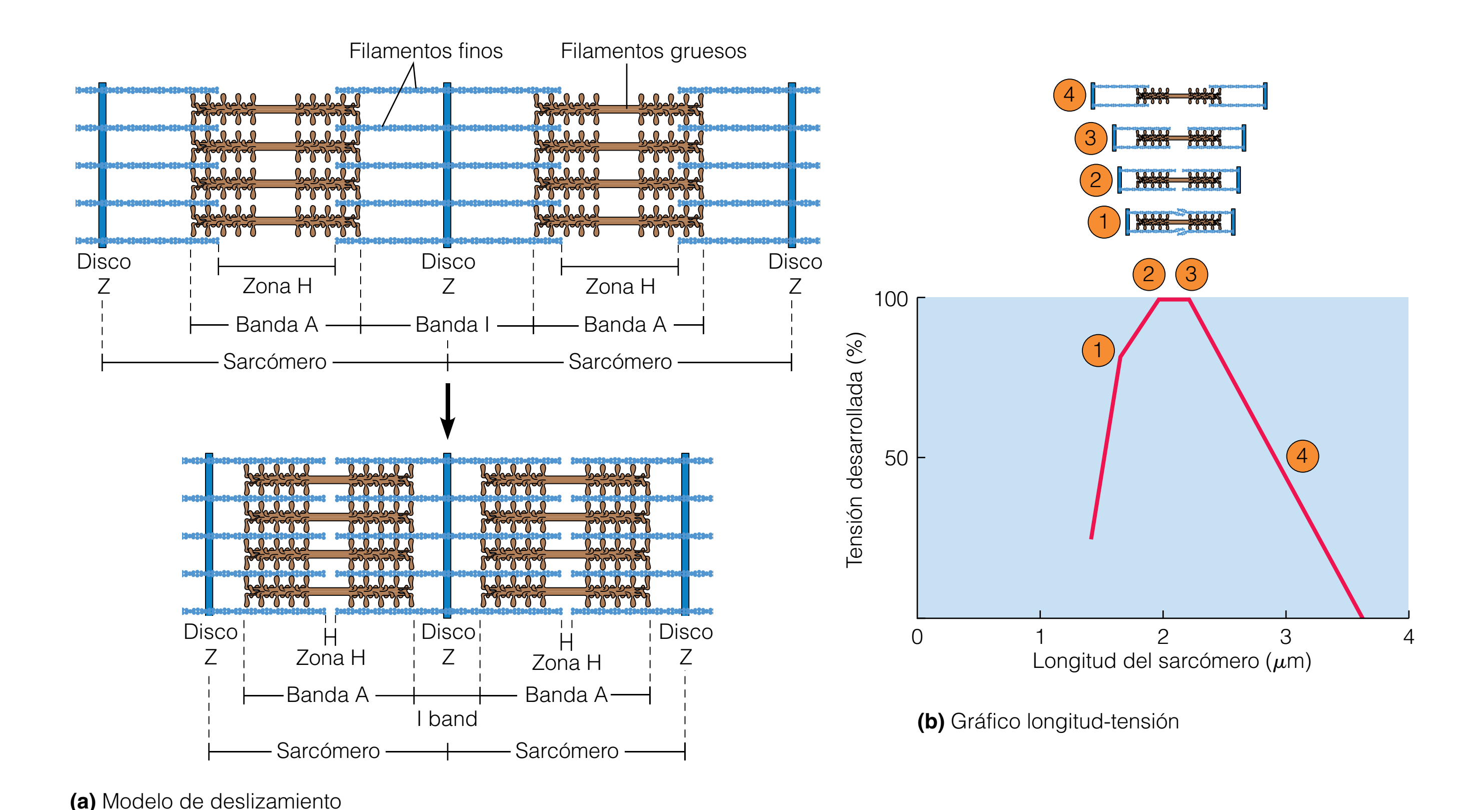


Figura 16.16 **El modelo de deslizamiento de la contracción muscular.** (**a**) Dos sarcómeros de una miofibrilla durante el proceso de contracción. El estado relajado se muestra en la parte superior y el aspecto de una miofibrilla más contraída se muestra en la parte inferior. Una miofibrilla se acorta mediante el deslizamiento progresivo de los filamentos gruesos y finos. El resultado es una interdigitación mayor de los filamentos sin que exista ningún cambio en la longitud de los filamentos. Mientras continúe la interpenetración durante la contracción, el aumento en la superposición entre los filamentos gruesos y los finos produce una disminución progresiva de la longitud de la banda I. (**b**) Este gráfico muestra que la cantidad de tensión desarrollada por el sarcómero es proporcional a la cantidad de superposición ente los filamentos finos y la región de los filamentos gruesos donde se encuentran las cabezas de miosina. Cuando el sarcómero comienza a acortarse, por ejemplo durante una contracción muscular, los discos Z se acercan, aumentando la cantidad de superposición entre los filamentos finos y los gruesos. Este solapamiento permite que una mayor parte del filamento grueso interacciona con el filamento fino. Por lo tanto, el músculo puede desarrollar una mayor tensión (obsérvese de 4 a 3). Esta proporcionalidad se mantiene hasta que los extremos de los filamentos finos penetran en la zona H. Aquí ya no pueden interaccionar con más cabezas de miosina, por lo que la tensión se mantiene constante (pasos de 3 a 2). Cualquier acortamiento adicional tiene como resultado una disminución brusca en la tensión (de 2 a 1), ya que los filamentos se agolpan entre sí.

mente, llega un punto en el que, aunque continúe el acortamiento, ya no aumenta la zona de superposición entre los filamentos finos y gruesos y la fuerza de contracción se mantiene. Cualquier acortamiento más allá de este punto, produce una dramática disminución en la tensión ya que los filamentos se agolpan uno sobre el otro.

El deslizamiento de los filamentos finos sobre los filamentos gruesos depende de las características estructurales del sarcómero y requiere energía. Estas observaciones básicas sugieren tres preguntas: (1) ¿Qué mantiene a los filamentos finos y gruesos parcialmente interdigitados y asociados unos con otros? (2) ¿A través de qué mecanismo los filamentos finos son atraídos o empujados hacia los espacios existentes entre los filamentos gruesos para provocar la contracción? (3) ¿Cómo se utiliza la energía del ATP en este proceso? La respuesta a estas preguntas se encuentra en el siguiente apartado.

Los puentes mantienen juntos los filamentos y el ATP impulsa su movimiento

Formación de puentes. La zona de superposición entre los filamentos finos y los gruesos, ya sea grande (en el músculo contraído) o mínima (en el músculo relajado), está siempre caracterizada por la presencia de **puentes** transitorios. Dichos puentes se forman mediante la unión entre la actina F del filamento fino y las cabezas de miosina del filamento grueso (Figura 16.17). Para que ocurra la contracción, los puentes se deben formar y disociar repetidamente y de manera tal, que cada ciclo de formación de puentes provoque que los filamentos finos se interdigiten más y más con los filamentos gruesos, produciendo de esta manera un acortamiento de los sarcómeros y la contracción de la fibra muscular. Una cabeza de miosina cualquiera en el filamento grueso experimenta ciclos repetidos en los que se une a subunidades específicas de actina del filamento fino. Después sufre un cambio conformacional dependiente de energía, que empuja al filamento fino y se une en otro punto más alejado del filamento fino, en dirección hacia el disco Z. La contracción es, por tanto, el resultado neto de la formación y ruptura repetida de muchos de estos puentes, en los que en cada ciclo, el filamento fino de una fibrilla se desplaza una distancia corta.

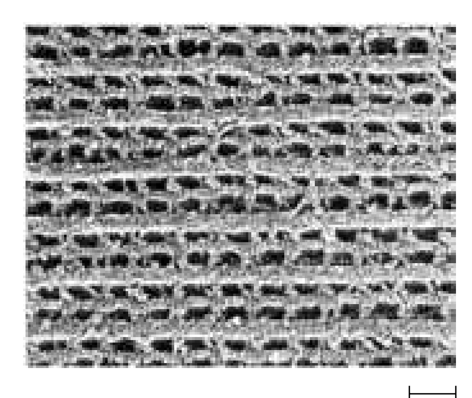


Figura 16.17 Puentes de cruzamiento. En esta micrografía electrónica de alta resolución, se pueden observar fácilmente los puentes entre los filamentos gruesos y los finos formados por las cabezas de miosina (TEM).

ATP y el ciclo de contracción. La fuerza impulsora de la formación de puentes es la hidrólisis del ATP, que está catalizada por una *ATP-asa que se activa por actina* y se encuentra en la cabeza de la miosina. La necesidad de ATP puede demostrarse in vitro, pues las fibras musculares aisladas se contraen en respuesta a la adición de ATP.

El mecanismo de la contracción se explica en la Figura 16.18, como un ciclo de cuatro etapas. En el paso ①, una cabeza de miosina determinada, en una configuración de alta energía que contiene ADP y una molécula de P_i (en suma, un ATP hidrolizado), se encuentra débilmente unida al filamento de actina. La cabeza de miosina pasa posteriormente a una configuración en la que su unión es más fuerte y que supone la pérdida de P_i. En la etapa ② tiene lugar el empuje del filamento. El paso de la miosina a una configuración de unión más intensa, desencadena un cambio conformacional en la misma, que resulta en la liberación del ADP. Este cambio de conformación tiene como consecuencia el movimiento de la cabeza, lo que provoca que el filamento grueso empuje al fino, que se desplaza con respecto al filamento grueso.

La ruptura de los puentes continúa en el paso ③, cuando el ATP se une a la cabeza de miosina. La unión del ATP produce otro cambio conformacional en la cabeza de la miosina, que debilita su unión a la actina. Si no se dispone de suficiente ATP, la ruptura de los puentes no tiene lugar, y el músculo se queda bloqueado en un estado rígido conocido como *rigor*. El *rigor mortis*, característico de la muerte, se produce por el agotamiento de ATP y la acumulación progresiva de puentes en la configuración que se muestra al final del paso ②. Obsérvese que una vez que se desunen, los filamentos gruesos y finos podrían regresar a la posición anterior, pero permanecen unidos por los puentes que se han formado a lo largo de su longitud, de la misma manera que, al menos algunas patas de un ciempiés, están siempre en contacto con la superficie sobre la que caminan. De hecho, cada filamento grueso tiene alrededor de 350 cabezas de miosina, y cada una de ellas se une y desune aproximadamente cinco veces por segundo durante una contracción rápida, por lo que en cualquier momento existen muchos puentes de cruzamiento entre los filamentos.

Finalmente, en el paso ④, la energía de la hidrólisis del ATP se usa para devolver a la cabeza de miosina a su configuración de alta energía, comenzando el siguiente ciclo de formación de puentes y deslizamiento de filamentos. Esto nos lleva al punto donde comenzamos, ya que la

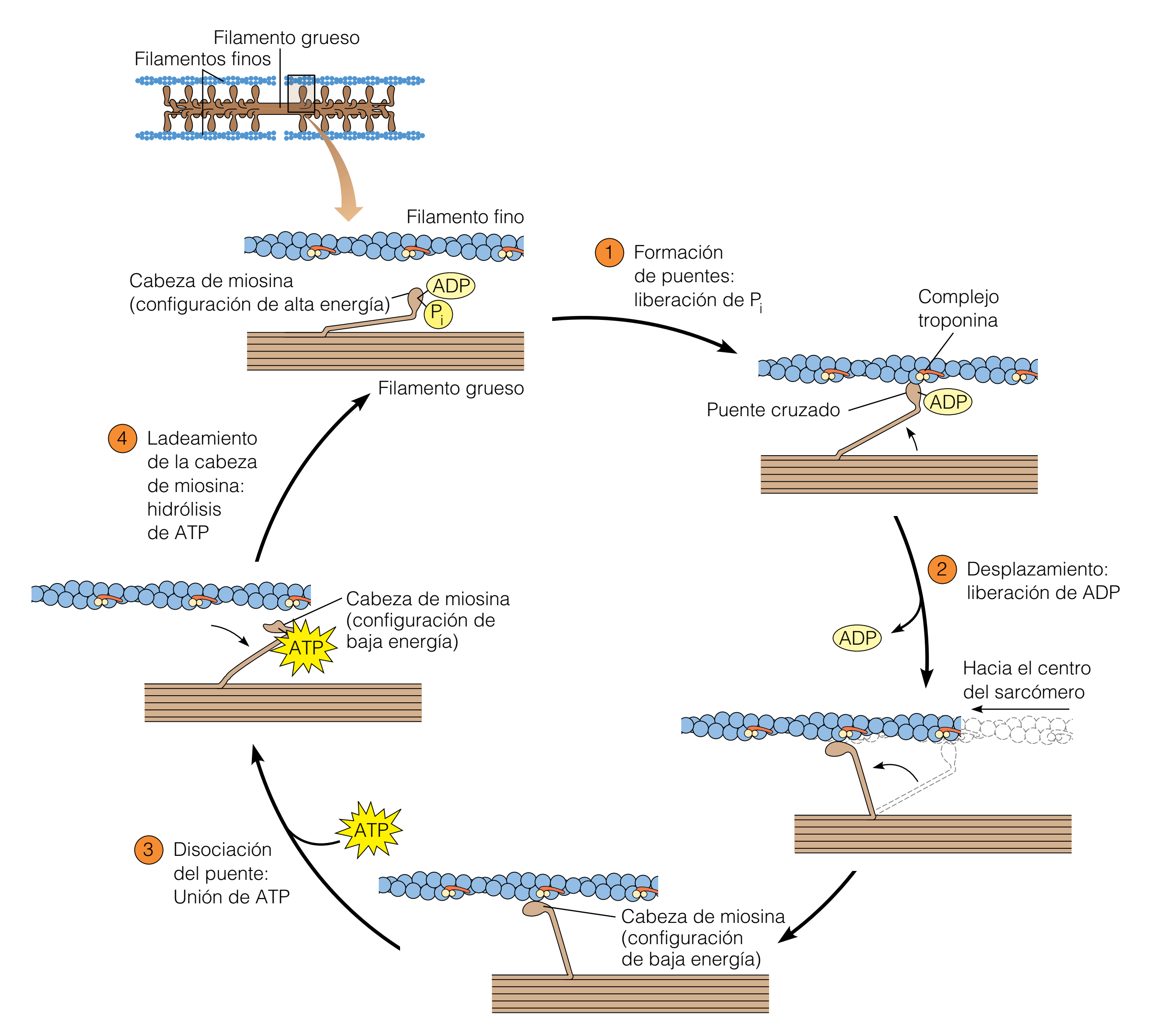


Figura 16.18 El proceso cíclico de la contracción muscular. En esta figura se ilustran, utilizando un pequeño segmento de filamentos finos y gruesos adyacentes (*véase* la imagen de la parte superior izquierda), los acontecimientos mediante los cuales las cabezas de miosina forman puentes con los filamentos finos en dirección al centro del sarcómero, provocando así la contracción de la miofibrilla. La etapa ① muestra la configuración de los puentes en el músculo relajado, mientras que el final de la etapa ② representa la configuración del músculo en rigor. En el texto se ofrece una descripción más detallada.

cabeza de miosina se encuentra ahora activada y lista para formar, de nuevo, un puente con la actina. Eso sí, el nuevo puente con la actina se formará en un punto posterior del filamento fino, porque el primer ciclo tiene como resultado el desplazamiento neto del filamento fino con respecto al grueso. En ciclos sucesivos, la miosina que se muestra en la Figura 16.18 recorrerá el filamento fino en la dirección de la contracción. ¿Y cuál es la dirección de la contracción? Recuerde que en el Capítulo 15 vimos que los filamentos de actina tienen extremos *más* y *menos*. La miosina II siempre avanza hacia el extremo *más* del filamento fino, estableciendo de esta manera la dirección de la contracción.

El calcio regula la contracción muscular

Hasta el momento nuestra descripción de la contracción muscular supone que el músculo se contrae de una manera continua siempre que haya suficiente ATP. Sin embargo, nuestra experiencia nos dice que la mayoría de los músculos esqueléticos pasan más tiempo en el estado relajado que contraídos. Por lo tanto, la relajación y la contracción deben estar reguladas para que la actividad muscular genere movimientos coordinados.

La función del calcio en la contracción. La regulación de la contracción del músculo depende de los iones de calcio (Ca^{2+}) libres y de la capacidad del músculo de aumentar y

disminuir rápidamente la concentración de calcio en el citosol (denominado *sarcoplasma* en las células musculares) alrededor de las miofibrillas. Las proteínas reguladoras tropomiosina y troponina actúan de una manera coordinada, para regular la disponibilidad de sitios de unión a la miosina en los filamentos finos, en función de la concentración de calcio en el sarcoplasma.

Para entender cómo funciona este proceso, debemos saber en primer lugar que los sitios de unión a la miosina en el filamento de actina están normalmente bloqueados por la tropomiosina. Para que la miosina se una a la actina y comience un ciclo de formación de puentes de cruzamiento, la tropomiosina se debe ser retirar. La dependencia del calcio de la contracción muscular viene determinada por la troponina C (TnC) que liga iones de calcio. Cuando un ion de calcio se une a la TnC, ésta sufre un cambio conformacional que se transmite a la molécula de tropomiosina, haciendo que se mueva hacia el centro del hueco de la hélice del filamento fino, y deje de bloquear el sitio de unión a la miosina. Los sitios de unión en la actina quedan libres para que se unan las cabezas de miosina y comience la contracción.

La Figura 16.19 ilustra cómo el complejo tropomiosina-troponina regula la interacción entre la actina y la miosina. Cuando la concentración de calcio en el sarcoplasma es baja ($<10^{-4}$ m*M*), la tropomiosina bloquea los sitios de unión en el filamento de actina e impide eficazmente su interacción con la miosina (Figura 16.19a). Como consecuencia, la formación de puentes se inhibe, y el músculo se relaja o permanece relajado. A mayores concentraciones mayores de calcio ($>10^{-3}$ m*M*), éste se une a la TnC, haciendo que las moléculas de tropomiosina cambien su posición, y permitiendo que las cabezas de miosina contacten con los sitios de unión en el filamento de actina y por lo tanto, comience la contracción (Figura 16.19b).

Cuando la concentración de calcio vuelve a disminuir como consecuencia de su bombeo fuera del citosol (lo analizaremos más adelante), se disocia el complejo troponina-calcio y la tropomiosina vuelve a la posición de bloqueo. Como consecuencia, se inhibe la unión de la miosina, la formación de puentes cruzados y el ciclo de contracción finaliza.

Así, un aumento en la concentración de calcio en el sarcoplasma estimula la contracción del músculo esquelético provocando los siguientes eventos:

1. El calcio se une a la troponina e induce un cambio conformacional del complejo.
2. Este cambio en la troponina provoca un cambio en la posición de la tropomiosina con la que está asociada.
3. Los sitios de unión sobre la actina quedan libres para interaccionar con la miosina.
4. Se forman los puentes de cruzamiento, poniendo en marcha la serie de eventos (ilustrados en la Figura 16.18) que llevan a la contracción.

Regulación de la concentración de calcio en las células del músculo esquelético. Todo lo anterior nos indica que la contracción muscular está regulada por la concentración de iones calcio en el sarcoplasma. Pero, ¿cómo se controla la concentración de calcio? Piense por un momento en lo que debe suceder cuando movemos cualquier parte de nuestro cuerpo, por ejemplo cuando flexionamos el dedo índice. En el cerebro se genera un impulso nervioso que se transmite a lo largo de la médula espinal hasta las *motoneuronas* (células nerviosas), que controlan un pequeño músculo del brazo. Las motoneuronas activan a las células musculares apropiadas, que se contraen y relajan, todo ello

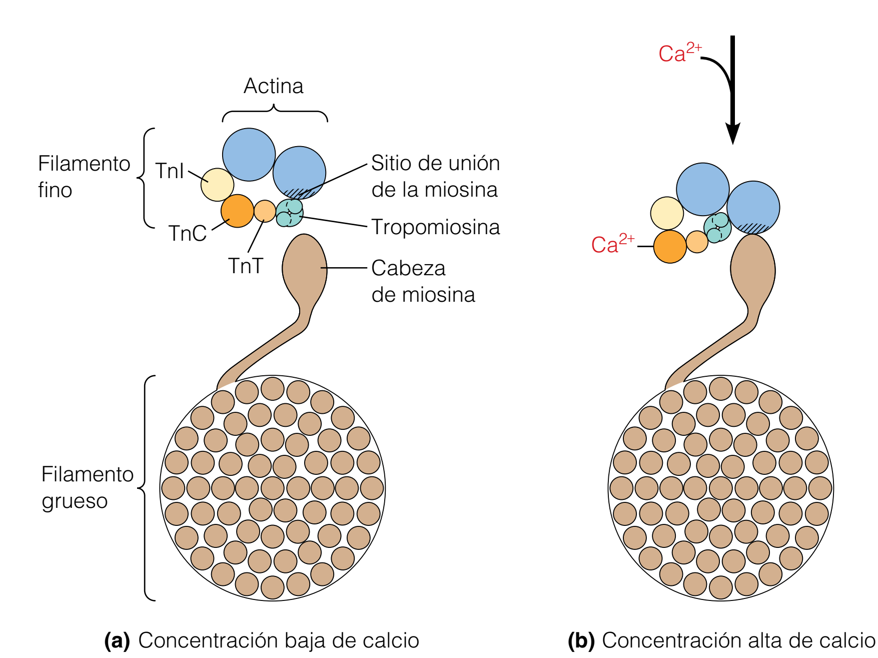


Figura 16.19 Regulación de la contracción en el músculo esquelético estriado. (**a**) A concentraciones bajas de calcio ($<10^{-4}$m*M* Ca^{2+}), el calcio no se une a la subunidad TnC de la troponina, la tropomiosina bloquea los sitios de unión en la actina, impidiendo el acceso de la miosina y por lo tanto manteniendo al músculo en el estado relajado. (**b**) A concentraciones altas de calcio ($>10^{-3}$m*M* Ca^{2+}), el ion se une a la subunidad TnC de la troponina e induce un cambio conformacional que se transmite a la tropomiosina. La molécula de tropomiosina se retira al centro del hueco del filamento fino, lo que permite que la miosina acceda a los sitios de unión en la actina y se desencadene la contracción.

en unos 100 mseg. Cuando el impulso nervioso cesa, la concentración de calcio disminuye rápidamente y el músculo se relaja. Así que para comprender cómo se regula la contracción muscular debemos saber antes cómo los impulsos nerviosos producen cambios en la concentración de calcio en el sarcoplasma, y cómo estos cambios afectan a la maquinaria contráctil. Las células musculares poseen unas características especiales que posibilitan los cambios rápidos en la concentración de iones calcio en el sarcoplasma y una rápida respuesta de la maquinaria contráctil; trataremos estos aspectos a continuación.

Procesos en la unión neuromuscular. Recuerde que en el Capítulo 13 vimos que la señal que hace que se contraiga una célula muscular, es un impulso eléctrico denominado *potencial de acción*, generado en la célula nerviosa. La neurona transmite el potencial de acción a la célula muscular a través de los axones. El sitio en el que la célula nerviosa inerva o hace contacto con la célula musculuar se llama **unión neuromuscular**. En la unión neuromuscular el axón se ramifica formando *terminales axónicos* que contactan con la célula muscular. Estos terminales contienen el transmisor químico *acetilcolina*, que está empaquetado en vesículas y se secreta en respuesta a un potencial de acción. La zona de la membrana plasmática de la célula muscular (denominada *sarcolema* en las células musculares) que se encuentra debajo de los terminales axónicos, se conoce como *placa motora terminal*. En la zona de la membrana plasmática y asociados a cada terminal axónico, se encuentran agrupaciones de receptores de acetilcolina. Los receptores de acetilcolina son *canales iónicos dependientes de ligando*, siendo su ligando en este caso la acetilcolina (*véase* Capítulo 13). Cuando la acetilcolina se une al receptor, se abre un poro en la membrana plasmática a través del cual entran en el interior de la célula muscular los iones sodio. El flujo de sodio a su vez provoca una despolarización en la membrana que se transmitirá lejos de la placa motora terminal.

Transmisión de un impulso al interior del músculo. Una vez que la despolarización tiene lugar en la placa motora terminal, se propaga por todo el sarcolema a través del **sistema de túbulos transversales (T)** (Figura 16.20). A diferencia de la membrana plasmática de la mayoría de las células, el sarcolema posee un patrón regular de invaginaciones que forman una serie de tubos denominados túbulos T, que penetran en el interior de la célula muscular. Los túbulos T transportan el potencial de acción al interior de la célula muscular, y son en parte responsables del hecho de que las células musculares respondan tan rápidamente al impulso nervioso.

Dentro de la célula muscular, el sistema de túbulos T se pone en contacto con el **retículo sarcoplásmico (SR)**, un sistema intracelular de membranas con forma de sacos o tubos aplanados. Como sugiere su nombre, el retículo sarcoplásmico es igual al retículo endoplásmico de las células no musculares, salvo por el hecho de que está altamente especializado. El SR recorre toda la miofibrilla, y está listo para liberar los iones de calcio directamente sobre ésta, provocando la contracción. Asimismo, es capaz de retirar el calcio, provocando la relajación. Esta proximidad del SR a las miofibrillas facilita una respuesta rápida de las células musculares a las señales nerviosas.

Función del SR en la liberación y recaptura de calcio. El SR puede dividirse funcionalmente en dos compartimientos: el *elemento medio* y la *cisterna terminal* (en latín *cisternae*; singular: *cisterna*) (*véase* Figura 16.20). La cisterna terminal del SR presenta una elevada concentración de bombas de

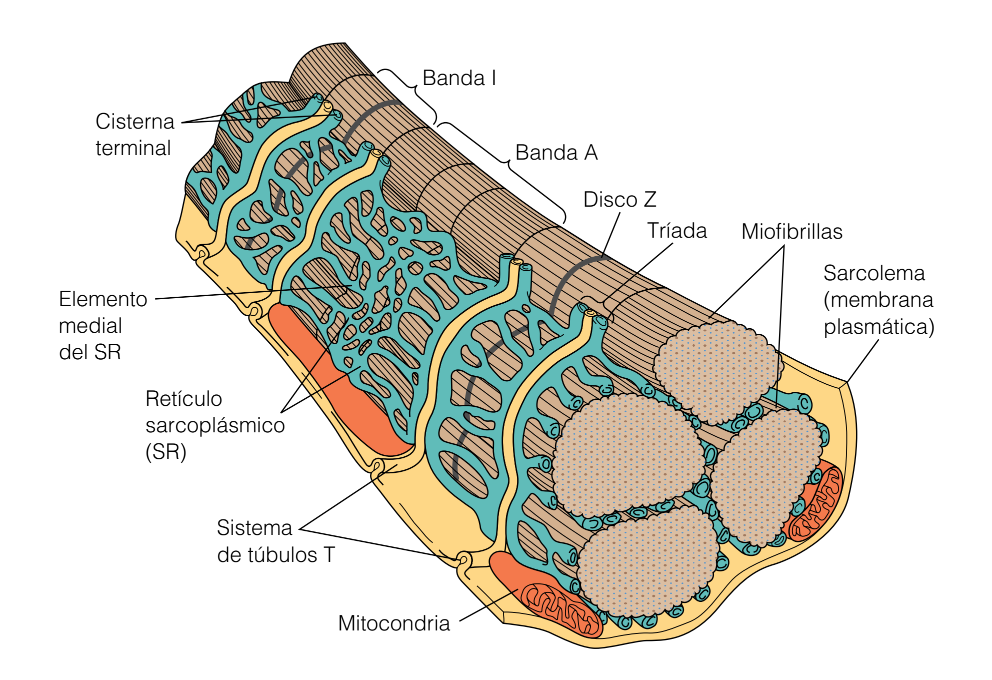


Figura 16.20 El retículo sarcoplásmico y el sistema de túbulos transversales de las células musculares esqueléticas. El retículo sarcoplásmico (SR) es una red extensa de RE especializados que acumulan iones de calcio y los liberan en respuesta a un impulso nervioso. Los túbulos T son invaginaciones del sarcolema (membrana plasmática) que transmiten los cambios de potencial de membrana al interior celular. En el lugar donde los túbulos T pasan cerca de la cisterna terminal del SR, se forma una estructura denominada tríada que aparece como la sección de tres tubos adyacentes en las micrografías electrónicas. El túbulo T se encuentra en el medio, y cada lado es una de las cisternas del SR. En la tríada se encuentra el complejo de unión, que regula la liberación de iones de calcio desde el SR.

calcio que bombean calcio continuamente hacia la luz del SR. La capacidad del SR de bombear calcio es crucial para la relajación muscular, pero es también necesaria para la contracción. El bombeo de calcio hace que la concentración del ion en la luz del SR sea alta (en el rango milimolar). Este calcio puede ser liberado desde las cisternas terminales del SR cuando sea preciso. La Figura 16.20 muestra cómo las cisternas terminales del SR se localizan cerca del aparato contráctil de cada miofibrilla. Las cisternas terminales se encuentran justo pegadas a un túbulo T, formando una estructura denominada **tríada.** En micrografías electrónicas, la tríada aparece con tres círculos en fila. El círculo central es la membrana del túbulo T, y los círculos de los lados son las membranas de las cisternas terminales. Un análisis más profundo de la tríada revela que las cisternas terminales parecen estar conectadas al túbulo T por un material denso que se encuentra entre las dos membranas. Este material se conoce como *complejo de unión* (del que hablaremos dentro de poco).

La cercanía entre el túbulo T, las cisternas terminales del SR y la maquinaria contráctil, explica el hecho de que las células musculares respondan al impulso nervioso tan rápidamente. Los potenciales de acción viajan desde la placa motora terminal, se propagan a lo largo del sarcolema y penetran en el túbuloT (Figura 16.21). A medida que el potencial de acción viaja por el túbulo T, pasa cerca de las cisternas terminales del SR, y provoca que se abra un tipo especial de canal de calcio. Cuando este canal se abre, el calcio inunda el sarcoplasma, provocando la contracción.

La liberación del calcio del SR provoca la contracción de la célula muscular. Para que el músculo se relaje, la concentración de calcio debe reducirse hasta los niveles basales. Esto se consigue a través del bombeo de calcio al interior del SR. La membrana del SR posee una proteína de transporte activo, una **ATPasa de calcio**, que es capaz de bombear calcio desde el sarcoplasma al interior del SR. El mecanismo dependiente de ATP a través del cual el calcio se mueve a través de la bomba, es similar al de la bomba sodio-potasio descrito en el Capítulo 8 (*véase* Figura 8.11).

El bombeo de retorno del calcio desde el sarcoplasma al interior de las cisternas del SR disminuye rápidamente la concentración del calcio sarcoplásmica hasta el punto en el que la troponina libera el calcio, la tropomiosina vuelve a su posición de bloqueo sobre la actina, y se inhibe la formación de puentes de cruzamiento adicionales. De esta manera, los puentes desaparecen rápidamente a medida que la actina se disocia de la miosina, que queda bloqueada por la tropomiosina. Esto hace que el músculo se relaje y pueda estirarse de nuevo, ya que la ausencia de puentes de cruzamiento permite que los filamentos finos se deslicen entre los filamentos gruesos, debido al estiramiento pasivo que producen otros tejidos sobre el músculo.

El acoplamiento eléctrico entre las células musculares cardíacas permite su contracción coordinada

El músculo cardíaco (del corazón) es el responsable del latido del corazón y del bombeo de la sangre por el sistema circulatorio del cuerpo. El músculo cardíaco funciona ininterrumpidamente; en solo un año, ¡su corazón late 40 millones de veces! El músculo cardíaco es muy similar al esquelético, en cuanto a que tiene una organización similar de los filamentos de actina y de miosina y a que presenta la misma apariencia estriada (Figura 16.22). Pero a diferencia del músculo esquelético, la energía necesaria para el latido del corazón en condiciones basales, no la proporciona la glucosa de la sangre, sino los ácidos grasos libres que son transportados por la albúmina sérica, una proteína sanguínea, desde el tejido adiposo (almacén de grasa) hasta el corazón.

Otra diferencia entre el músculo cardíaco y el esquelético es que las células cardíacas no son multinucleadas. En

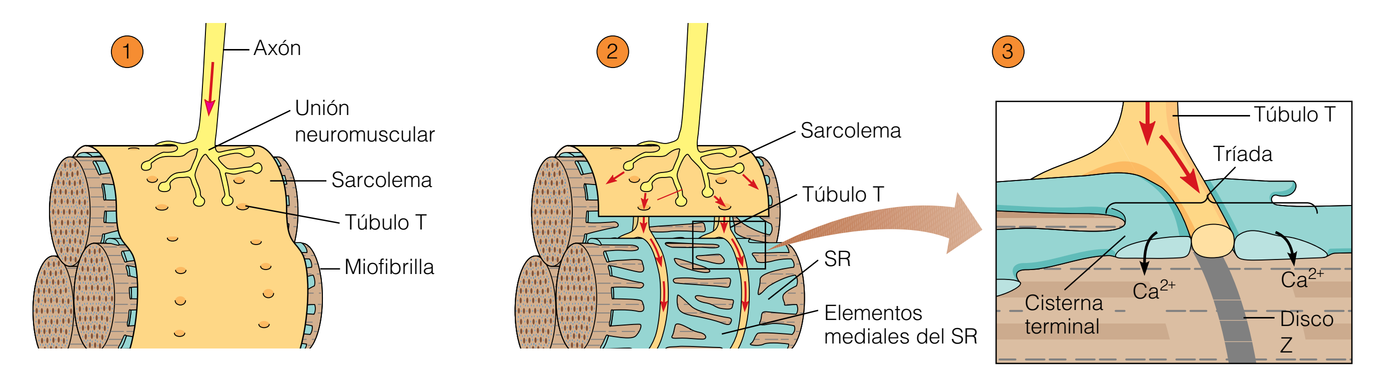


Figura 16.21 Estimulación de una célula muscular por un impulso nervioso. ① El potencial de acción se transmite a lo largo del axón de una neurona hasta que alcanza la unión neuromuscular, donde se encuentran las sinapsis entre la neurona y la célula muscular. ② La despolarización de los terminales axonales provoca la liberación del neurotransmisor, que se une a los receptores de acetilcolina en la superficie de la célula muscular. La unión del neurotransmisor a los receptores de acetilcolina produce la despolarización de la célula muscular. La despolarización se propaga a lo largo de la superficie de esta célula y en el interior, a través de los túbulos T. ③ En el interior de la célula muscular, la despolarización estimula la liberación de calcio desde las cisternas terminales del SR.

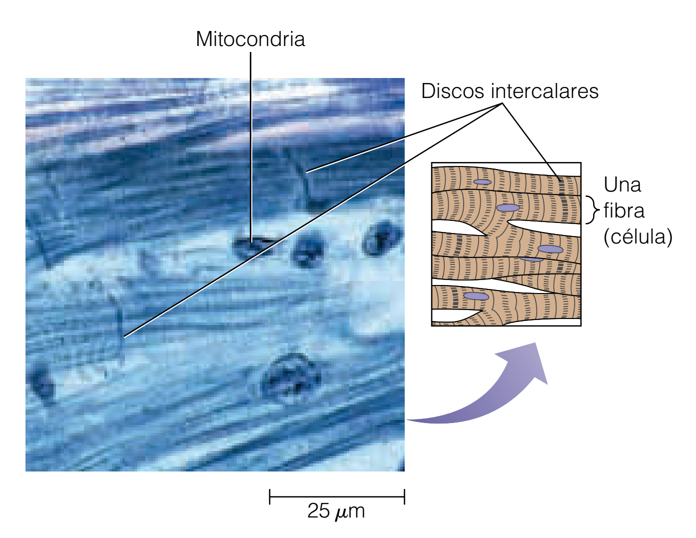


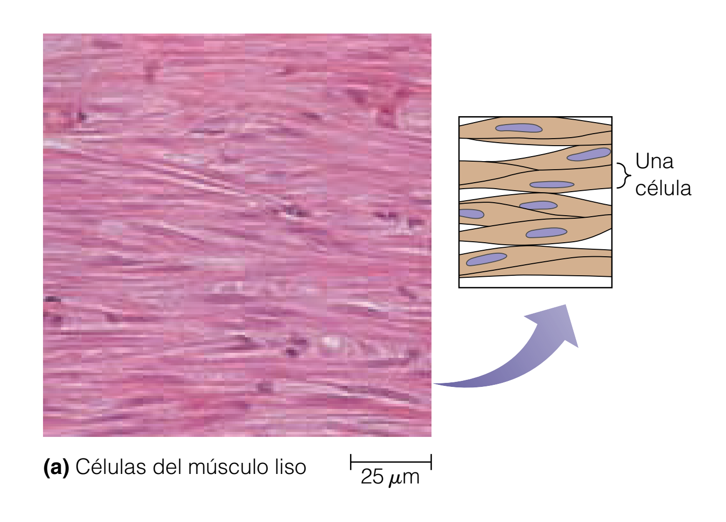
Figura 16.22 Células musculares cardíacas. Las células musculares cardíacas tienen un mecanismo contráctil y una estructura del sarcómero similar a la de las células del músculo esquelético. Sin embargo, las células musculares cardíacas están unidas por sus extremos gracias a los discos intercalares, que permiten el paso de iones y de señales eléctricas de una célula a otra. Esta permeabilidad iónica permite que el estímulo contráctil se propague uniformemente a todas las células del corazón (LM).

lugar de esto, las células están unidas unas a otras por sus extremos mediante unas estructuras denominadas **discos intercalares**. Estos discos tienen uniones comunicantes (gap) (*véase* Capítulo 17) que acoplan eléctricamente a las células vecinas, lo que permite que las ondas de despolarización se propaguen a través de todo el corazón durante su ciclo de contracción. El corazón no se activa por impulsos nerviosos, a diferencia del músculo esquelético, sino que se contrae de forma espontánea aproximadamente una vez cada segundo. El ritmo cardíaco está controlado por una región «marcapasos» situada en la parte superior del corazón (aurícula derecha). La onda de despolarización se inicia en el marcapasos y se propaga después al resto del corazón para producir el latido cardíaco.

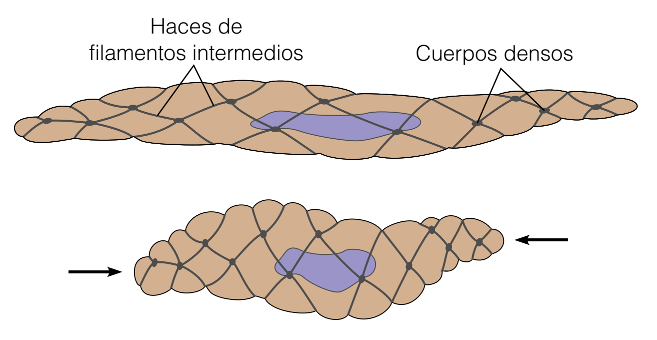
El músculo liso se asemeja más a las células no musculares que al músculo esquelético

El músculo liso es el encargado de la contracción involuntaria como la del estómago, el intestino, el útero y la de los vasos sanguíneos. En términos generales, dichas contracciones son lentas, y tardan 5 segundos en alcanzar su tensión máxima. Las contracciones del músculo liso generalmente duran más que las del músculo esquelético o cardíaco. Aunque el músculo liso no sea capaz de contraerse rápidamente, es capaz de mantener la tensión durante periodos de tiempo prolongados, como se requiere en los órganos y tejidos mencionados anteriormente.

Estructura del músculo liso. Las células musculares lisas son largas y finas, con extremos puntiagudos. A diferencia de los músculos esquelético y cardíaco, el músculo liso no presenta estrías (Figura 16.23a). Las células musculares lisas carecen de discos Z, que son los responsables de la organización periódica de los sarcómeros de las células musculares cardíacas y esqueléticas. En su lugar, las células musculares lisas presentan *cuerpos densos*, que son estructuras con forma de placa que contienen filamentos intermedios y que se encuentran en el citoplasma y en la membrana celular (Figura 16.23b). A estos cuerpos densos, se anclan haces de filamentos de actina por sus extremos. Como consecuencia, los filamentos de actina aparecen entrecruzados, alineados de manera oblicua al eje mayor de la célula. Los filamentos finos y gruesos en el músculo liso están conectados por puentes de cruzamiento, pero no de la manera regular y repetitiva que hemos visto en el músculo esquelético.



(a) Células del músculo liso



(b) Contracción de una célula del músculo liso

Figura 16.23 Músculo liso y su contracción. (**a**) Las células musculares lisas son largas y con forma de huso, sin sarcómeros ni discos Z (LM). (**b**) En la célula del músculo liso, los haces contráctiles de actina y de miosina aparecen anclados a unas estructuras con forma de placa denominadas cuerpos densos. Los cuerpos densos están conectados unos a otros a través de filamentos intermedios, orientando de esta manera los haces de actina y miosina oblicuamente al eje mayor de la célula. Cuando los haces de actina y miosina se contraen, tiran de los cuerpos densos y de los filamentos intermedios, produciendo la contracción celular que se muestra en esta figura.

Regulación de la contracción en las células musculares lisas. La contracción de las células musculares lisas y de las células no musculares se regula de manera diferente a como se regula en las células del músculo esquelético. Tanto en las células del músculo esquelético como en las células del músculo liso, el estímulo que desencadena la contracción es el aumento de la concentración sarcoplásmica de iones de calcio; sin embargo, los mecanismos que están implicados son bastantes diferentes. Cuando la concentración sarcoplásmica de calcio se eleva en las células no musculares y en las del músculo liso, se ponen en marcha una serie de fenómenos, que suponen la activación de la **quinasa de cadenas ligeras de miosina** (**MLCK**). La MLCK activada, fosforila un tipo de cadena ligera de la miosina conocida como **cadena ligera reguladora** (*véase* Figura 16.9, miosina II).

La fosforilación de la cadena ligera de la miosina afecta a la miosina de dos maneras. En primer lugar, algunas moléculas de miosina están hechas un ovillo, de tal manera que no forman filamentos. Cuando la cadena ligera de la miosina se fosforila, la cola de la miosina se desenrosca y puede así formar los filamentos. En segundo lugar, la fosforilación de la cadena ligera activa a la miosina, posibilitando su interacción con los filamentos de actina y por lo tanto, llevar a cabo el ciclo de formación de puentes de cruzamiento.

La Figura 16.24a muestra la cascada de eventos que ocurren durante la activación de la miosina no muscular y la del músculo liso. Como consecuencia de la llegada de un impulso nervioso o de una señal hormonal a un músculo liso, se produce una entrada de calcio extracelular, que hace que la concentración de calcio intracelular aumente y se produzca la contracción. El efecto de la concentración de calcio sobre la contracción está mediado por la unión del calcio a la *calmodulina*. El *complejo calcio-calmodulina* puede unirse a la quinasa de la cadena ligera de la miosina, activándola. Esto tiene como resultado la fosforilación de las cadenas ligeras de la miosina, y que ésta pueda interaccionar con la actina provocando la contracción.

La regulación de MLCK por el calcio y la calmodulina es un ejemplo de un patrón común en la regulación de las proteínas quinasas. La MLCK contiene una secuencia peptídica en un extremo denominada *pseudosustrato*, que es una secuencia de aminoácidos similar a la del sustrato normal de la enzima. En este caso, el sustrato real es una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de la miosina que es reconocida por la MLCK. Dentro de esta secuencia se encuentra la serina que acepta el fosfato del ATP. En el pseudosustrato, en la posición de esta serina se encuentra otro aminoácido que no puede aceptar el grupo fosfato.

La región del pseudosustrato de MLCK es responsable de su propia inhibición. Este tipo de inhibición enzimática se conoce como *autoinhibición*, porque, efectivamente, es la propia enzima quien se inhibe a sí misma. No obstante, existe también un sitio de unión a calcio-calmodulina próximo a la región del pseudosustrato. Cuando la calcio-calmodulina se une a la MLCK, el pseudosustrato ya no es capaz de inhibir a la enzima, y ésta se activa.

Una vez activada, la MLCK puede fosforilar a la miosina. La fosforilación de la cadena ligera de la miosina, provoca la activación de la miosina. Esto supone la capacidad de interaccionar con la actina y que se desenrosquen las colas de la miosina y puedan interaccionar con otras moléculas de miosina formando filamentos (Figura 16.24b). Cuando vuelve a disminuir la concentración de calcio en la célula del músculo liso, la MLCK se inactiva, y otra enzima, la *fosfatasa de cadenas ligeras de miosina*, elimina el grupo fosfato de la cadena ligera de la miosina. El músculo entonces se relaja, ya que la miosina defosforilada es incapaz de interaccionar con la actina.

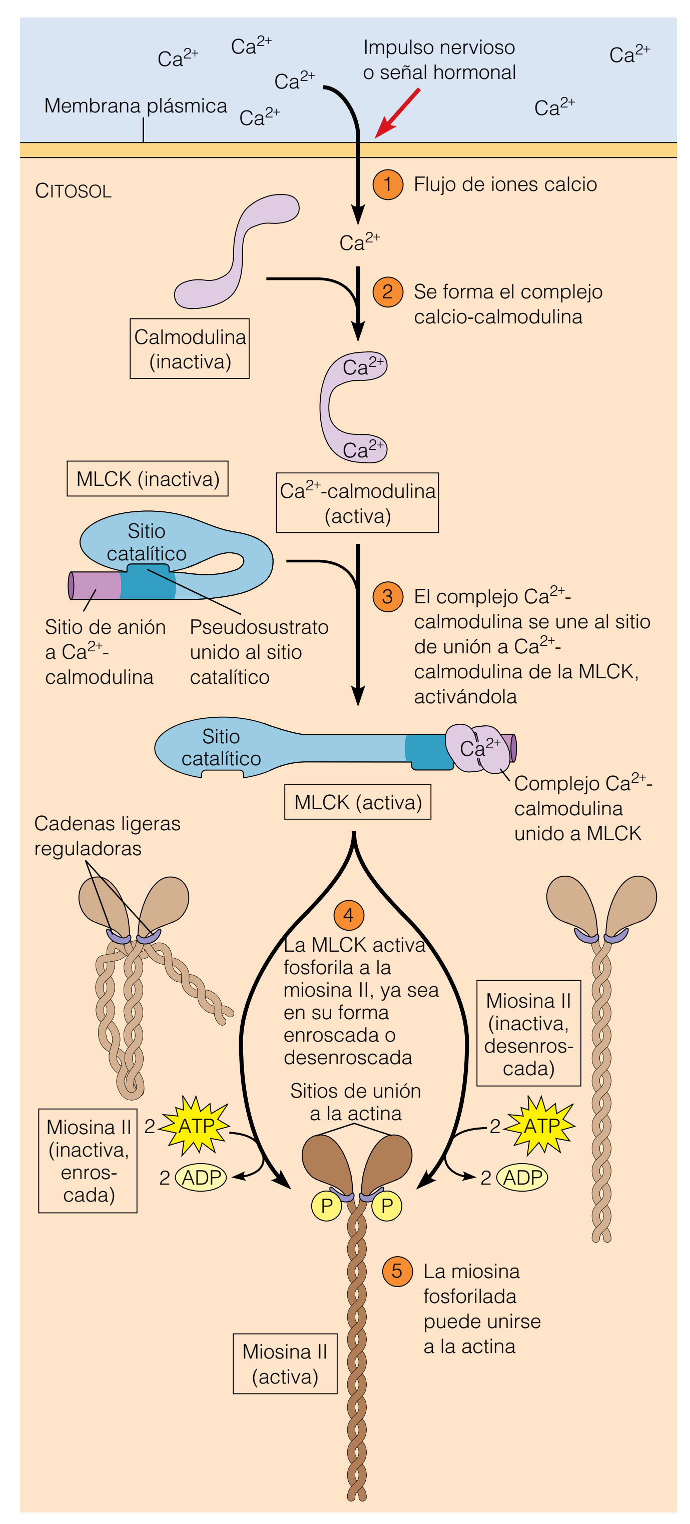
Los iones de calcio activan la contracción tanto en el músculo esquelético como en el liso, pero lo hacen a través de diferentes mecanismos y además tiene un origen distinto. En el músculo esquelético el calcio proviene del retículo sarcoplásmico. Su efecto sobre la interacción miosina-actina está mediado a través de la troponina y es muy rápido, porque únicamente depende de cambios conformacionales. En el músculo liso, el calcio proviene del exterior celular, y su efecto está mediado a través de la calmodulina. En este caso, el efecto es más lento porque implica la modificación covalente (fosforilación) de la molécula de miosina.

Movimientos basados en actina, en células no musculares

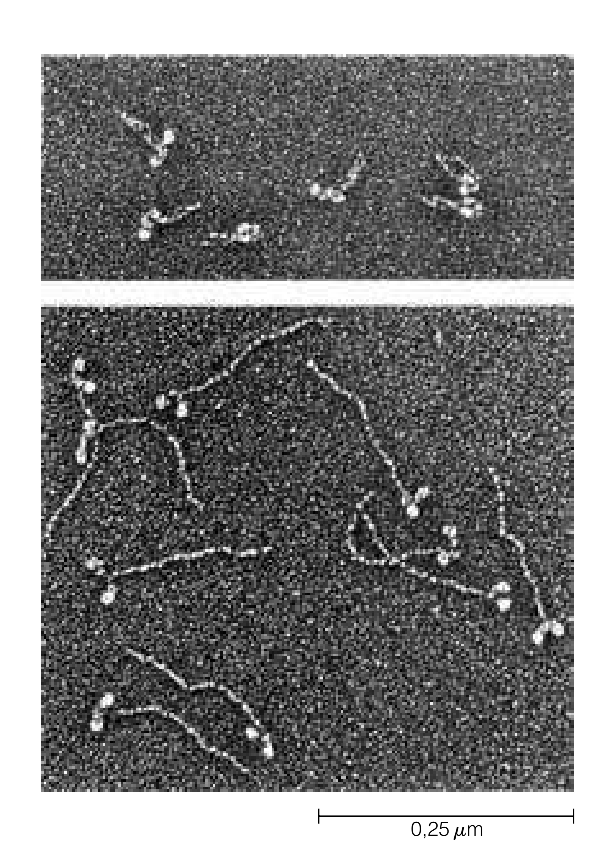
El aspecto mejor conocido de la actina y la miosina es su papel como principales componentes de los filamentos finos y gruesos de las células musculares. No obstante, las células musculares son sólo un caso muy especializado de movimientos celulares mediados por la interacción de la miosina y la actina. En casi todas las células eucariotas se ha encontrado miosina y actina y se sabe que desempeñan un papel muy importante en varios tipos de movimientos no musculares. Un ejemplo de esta motilidad dependiente de actina es el que ocurre durante la citoquinesis (*véase* Capítulo 19). En este apartado, trataremos otros ejemplos.

La migración celular por lamelipodios implica ciclos de extensión, unión, cambio de lugar y desunión

Los microfilamentos de actina (MFs) son necesarios para el movimiento de la mayoría de las células animales no musculares. Muchas células no musculares, como los fibroblastos, el cono de crecimiento de las neuronas, y muchas células embrionarias de animales, son capaces de reptar sobre un sustrato. En este apartado, estudiaremos un ejemplo de este tipo de movimiento en el que intervienen los filopodios y lamelipodios, cuya estructura interna ya examinamos en el Capítulo 15. Más adelante en otro apar-



(a) Fosforilación de la miosina II por la quinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK)



(b) Moléculas de miosina enroscadas y desenroscadas

Figura 16.24 Fosforilación de la miosina en las células del músculo liso y en células no musculares. (**a**) La función de las miosinas II no musculares y las del músculo liso están reguladas por la fosforilación de las cadenas ligeras reguladoras. ① Un impulso nervioso o una señal hormonal desencadena la entrada de iones de calcio en la célula. ② Cuando alcanzan una concentración lo suficientemente elevada, los iones de calcio se unen a la calmodulina, formando un complejo calcio-calmodulina activo. ③ El complejo calcio-calmodulina se une a una región de la quinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) que se solapa con la región del pseudosustrato. Cuando esto ocurre, la parte del pseudosustrato se suelta, activándose así la MLCK. ④ La MLCK activada fosforila a las cadenas ligeras de la miosina, esté la miosina enroscada o desenroscada. ⑤ La miosina activada (y desenroscada) puede unirse a la actina y experimentar el ciclo de formación de puentes de cruzamiento. (**b**) Micrografías electrónicas de moléculas de miosina enroscadas y desenroscadas (TEMs).

tado, estudiaremos el movimiento ameboide, que representa otro ejemplo especializado de este movimiento.

El reptado de una célula incluye varios procesos: (1) extensión de una protrusión en el extremo guía de la célula; (2) unión de la protrusión al sustrato; (3) generación de tensión, que empuja la célula hacia delante; y (4) liberación de las uniones y retracción de la «cola» de la célula. Estos procesos se recogen en la Figura 16.25.

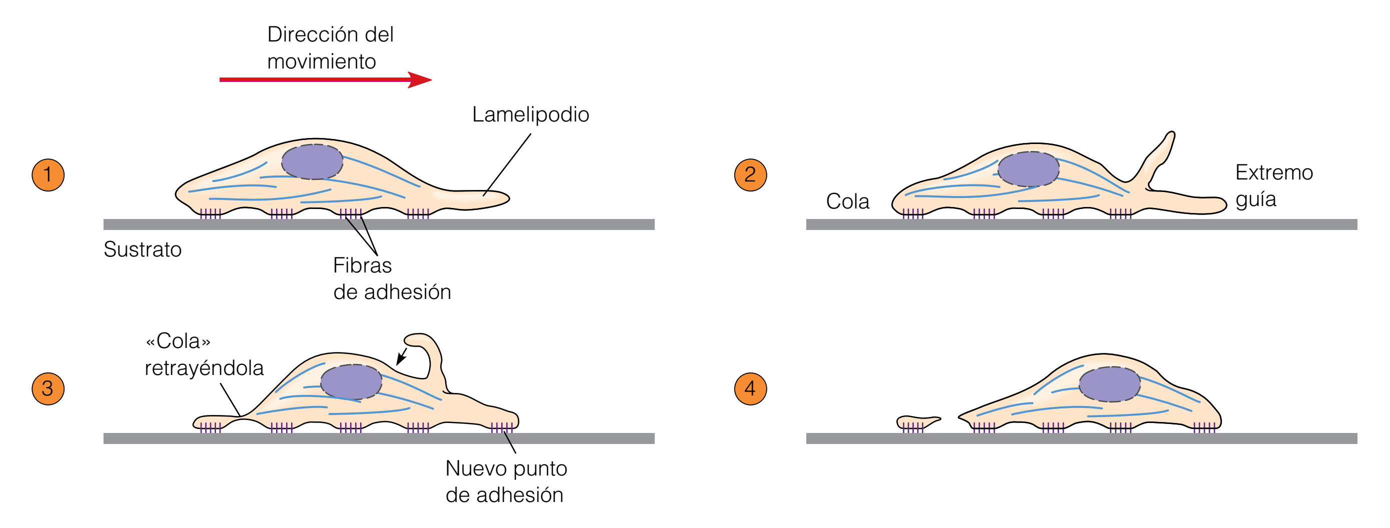


Figura 16.25 Etapas en el reptado de una célula. En el reptado celular tienen lugar varios procesos, que incluyen la protrusión celular, unión al sustrato y fenómenos contráctiles. En este esquema podemos ver cómo el extremo guía de un macrófago ①, forma protrusiones (lamelipodios) que se extienden en la dirección del movimiento. ② Estas protusiones pueden adherirse al sustrato, o bien pueden extenderse y retraerse. ③ Cuando las protrusiones se adhieren, proporcionan puntos de anclaje para los filamentos de actina. ④ La tensión en los filamentos de actina puede producir el avance del resto de la célula. Puede suceder que la célula se adhiere fuertemente al sustrato, y que esto produzca que una parte de la cola se rompa y se quede atrás mientras la célula avanza.

En la Figura 16.26 se muestra una micrografía de microscopía electrónica de barrido de una célula reptando.

Protrusiones. Para reptar, una célula debe producir extensiones, o *protrusiones*, en su parte frontal, o *extremo guía*.

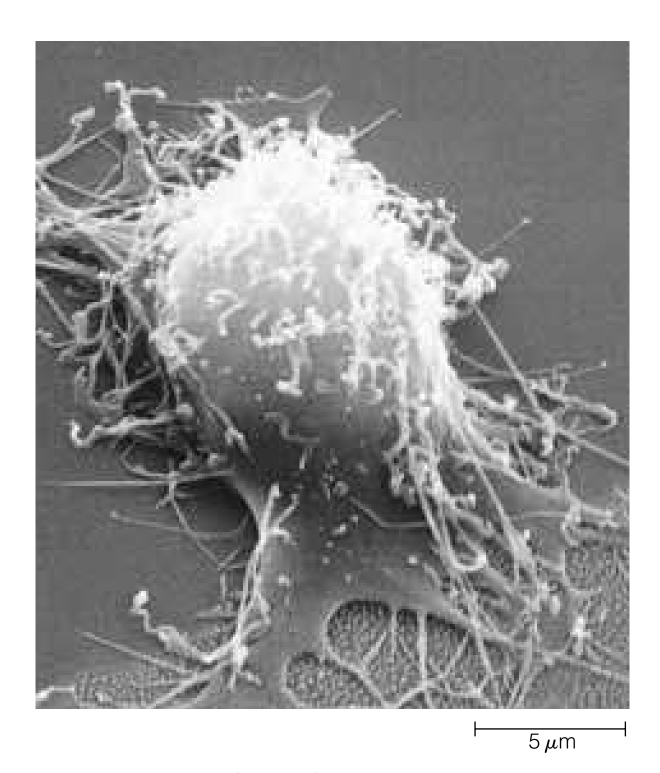
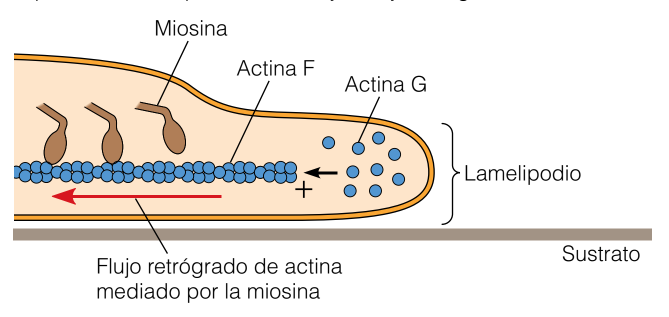


Figura 16.26 Micrografía electrónica de barrido de un fibroblasto de ratón con numerosos filopodios que se extienden desde la superficie celular.

Un tipo de protrusión es una fina lámina de citoplasma denominada **lamelipodio** (en latín: *lamellipodium*; plural: *lamellipodia*). Otro tipo de protrusión es una estructura puntiaguda y fina conocida como filopodio (en latín: *filopodium*; plural: *filopodia*). Estos dos tipos de protrusiones, a menudo, se convierten una en otra, durante la migración de una célula reptante.

El **flujo retrógrado de la actina F** constituye un fenómeno fundamental en la dinámica de las protrusiones. El flujo retrógrado ha sido estudiado con profundidad en células nerviosas en cultivo, que muestran unos apéndices reptantes denominados *conos de crecimiento*. Este proceso parece ser fundamental en la migración de muchas células. Durante el flujo retrógrado, existe un movimiento neto de los microfilamentos hacia la parte de atrás de la protrusión a medida que ésta se extiende. Estas estructuras filamentosas desaparecen poco a poco si se tratan las células con citocalasina, lo que demuestra que están compuestos fundamentalmente por actina. El flujo retrógrado parece ser consecuencia de dos procesos simultáneos: *Ensamblaje de la actina* en la punta del lamelipodio o filopodio en crecimiento, y una *translocación trasera* de los filamentos de actina hacia la base de la protrusión (Figura 16.27). En una célula normal el ensamblaje en el frente y la translocación trasera están en equilibrio; en función de que predomine uno u otro, la protrusión se extenderá o retraerá.

A la vez que tiene lugar la extensión de la punta de la protrusión, la actina polimerizada es dirigida hacia la base de la protrusión, donde se despolimeriza. Los monómeros de actina liberados quedan disponibles para incorporarse a los extremos *más* de microfilamentos nuevos o en creci-



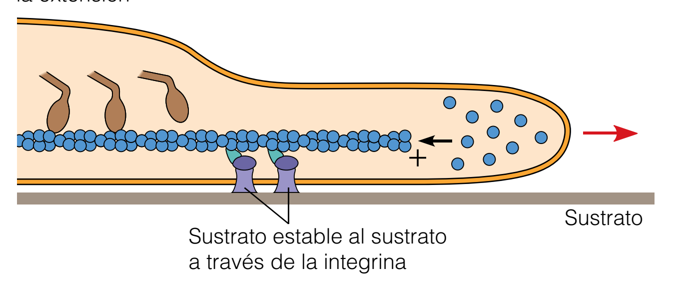


Figura 16.27 Unión al sustrato y formación de protrusiones en una célula en migración. Modelo que explica cómo las uniones funcionan como un «embrague» que permite el avance de la célula. Los microfilamentos están orientados en un lamelipodio con sus extremos *más* (barbados) hacia la punta de las protrusiones. En una protrusión inmóvil, el flujo retrógrado mediado por las miosinas dirigen los microfilamentos hacia la parte trasera, al mismo tiempo que los monómeros de actina G se incorporan en la punta de la protrusión. Cuando el flujo retrógrado es frenado mediante la unión al sustrato (es decir, se acopla el «embrague»), la polimerización produce la elongación de la protrusión y el movimiento hacia delante.

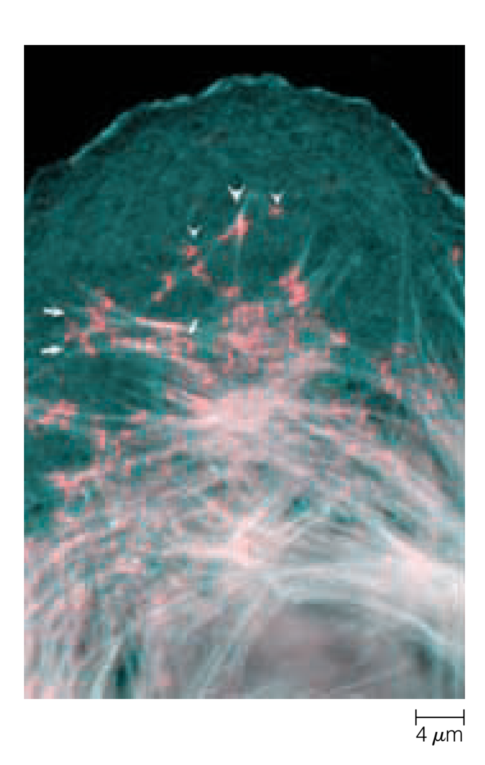


Figura 16.28 Distribución general de la miosina II y la actina en un fibroblasto. En las proximidades del extremo guía (parte superior), la miosina se encuentra formando pequeñas manchas (puntas de flecha), que no están asociadas con estructuras de actina bien definidas. Algunas manchas (cabezas de flecha más grandes) aparecen en el punto que se juntan pequeños haces de actina. Las manchas de miosina más alejadas del frente, se alinean a lo largo de los filamentos de actina (flechas).

miento, mientras que la célula continúa reptando hacia delante. La translocación trasera de los polímeros de actina está dirigida seguramente por miosinas. Diversos estudios han mostrado que la miosina II es abundante en la base de los lamelipodios de varios tipos celulares (Figura 16.28) y que determinadas sustancias que desorganizan los motores de miosina, inhiben el flujo retrógrado.

Unión al sustrato. La unión o la adhesión de la célula al sustrato, es también necesaria para el reptado de la célula. Se deben formar nuevos sitios de unión en la parte frontal de la célula, y se deben romper los contactos en la parte trasera. Los sitios de unión entre la célula y el sustrato son estructuras complejas, constituidas por la unión de proteínas de la membrana plasmática a otras proteínas, tanto del exterior, como del interior de la célula. Las *integrinas*, que estudiaremos en el Capítulo 17, son una familia de estas proteínas de unión. En el exterior de la célula, las integrinas se unen a proteínas de la matriz extracelular. En el interior, las integrinas se conectan a los filamentos de actina a través de proteínas de enlace.

La adhesión más o menos fuerte de una célula a su sustrato, probablemente ayude a romper el equilibrio entre el flujo retrógrado y la incorporación de subunidades de actina en el extremo *más*. Desde este punto de vista, el flujo retrógrado se asemeja a un coche en punto muerto. Una vez que se introduce una marcha, el coche se mueve rápidamente hacia delante. De igual manera, la unión fuerte del extremo guía al sustrato, resiste el flujo retrógrado y rompe el equilibrio a favor del movimiento hacia delante (Figura 16.27).

Translocación y desunión. Una célula reptante coordina la formación de protrusiones y la unión al sustrato con el avance de toda la célula. La contracción de la parte trasera de la célula empuja al resto de ésta hacia delante y la libera de sus uniones en la parte trasera. Diversos estudios sugieren que la contracción está mediada por la interacción entre las miosinas y la actina. La miosina II no se localiza únicamente en la base de las protrusiones, sino más allá, hacia la parte trasera de la célula. En células mutantes que no poseen miosina II del moho del cieno *Dictyostelium*, la capacidad de retraer el extremo trasero de la célula está

disminuida, lo que apoya la idea de la implicación de la miosina en esta contracción.

La contracción de la célula debe estar acoplada a la desunión del sustrato del extremo trasero de la célula. Esta desunión supone la ruptura de los contactos de adhesión. Los contactos de una célula en su parte trasera son, a veces, muy fuertes y la cola de la célula se rompe durante el desplazamiento (*véase* Figura 16.25). En general, la intensidad de las uniones de una célula a su sustrato determina la velocidad a la que esta célula puede migrar.

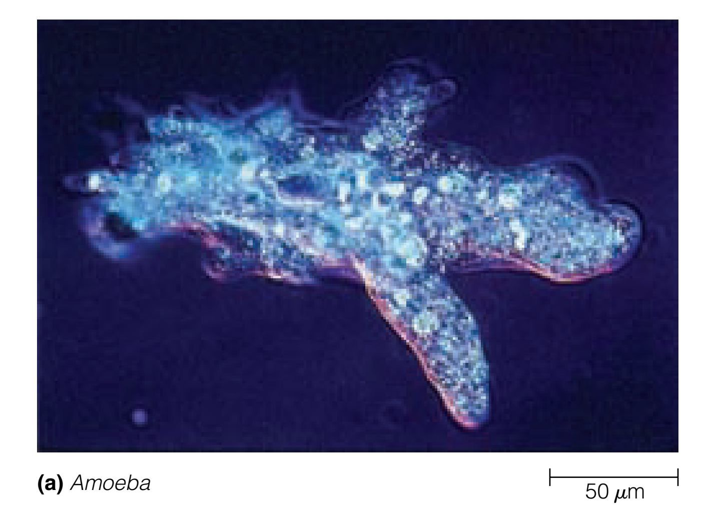
El movimiento ameboide se basa en ciclos de gelificación y solificación del citoesqueleto de actina

Las amebas, el moho del cieno y los leucocitos desarrollan un tipo de movimiento reptante conocido como **movimiento ameboide** (Figura 16.29). Este tipo de movimiento viene acompañado de la formación de protrusiones del citoplasma denominadas **pseudopodos** (del latín *pseudopodia*; singular: *pseudopodium*, que proviene del griego y significa «falso pie»). Las células que muestran este tipo de movimiento presentan una capa externa de citoplasma gelatinoso y espeso, denominado *ectoplasma* y una capa interna de un citoplasma más fluido que se conoce como *endoplasma*. En una ameba, a medida que un pseudopodo se extiende, el endoplasma fluye hacia delante, dirigiéndose hacia la extensión y se solidifica en ectoplasma en la punta del pseudopodo. Mientras tanto, en la parte trasera de la célula, el ectoplasma se transforma en endoplasma que fluye hacia el pseudopodo. La alternancia entre estos estados del citoesqueleto de actina se denomina **gelificación-solificación**. Las proteínas como la gelsolina que se encuentran en estos geles, pueden ser activadas por calcio para convertir el gel en la forma de sol, más fluida. Se ha demostrado en varios experimentos que el flujo hacia delante en el pseudopodo no requiere que la parte trasera de la célula se contraiga: cuando se elimina la membrana celular de un pseudopodo con detergentes, los componentes restantes son capaces de producir aquel flujo si se administran los iones y sustancias químicas necesarias. La presión ejercida sobre el endoplasma, posiblemente producida por la contracción de una red de actomiosina en el extremo trasero de la célula, puede impulsarlo también hacia delante, ayudando a la formación de una protrusión en el extremo guía.

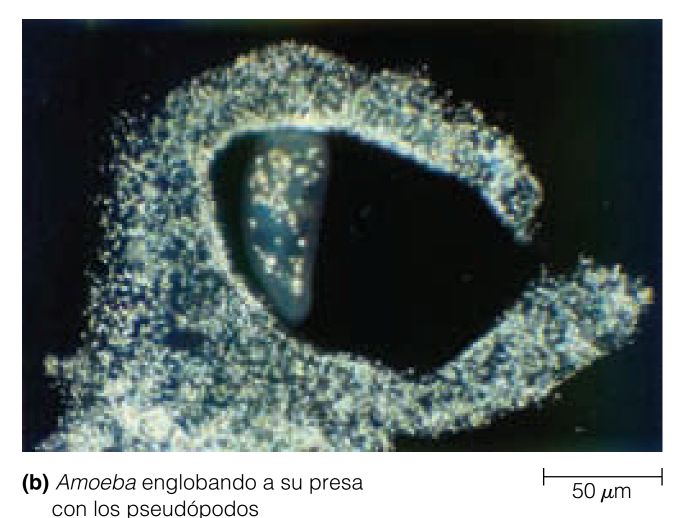
Los componentes celulares de algunas células se mueven gracias a corrientes citoplasmáticas

Las corrientes citoplasmáticas, un movimiento del citosol dependiente de actomiosina, se observa en varios organismos que no manifiestan movimiento ameboide. Por ejemplo, en algunos mohos del cieno como *Physarum polycephalum* las corrientes citoplásmicas van y vienen por toda la red ramificada que constituye su masa celular.

Muchas células vegetales muestran un flujo circular de los componentes celulares alrededor de una vacuola central. Este flujo, conocido como *ciclosis*, ha sido muy estudiado en el alga gigante *Nitella*. En este caso, el movimiento hace circular los componentes celulares y los mezcla. En el flujo citoplásmico participan los filamentos de actina, y se inhibe cuando se trata a las células con citocalasina. En *Nitella*, cerca de los sitios donde tiene lugar la ciclosis, se encuentra un conjunto de microfilamentos alineados. En la ciclosis, también participan, probablemente, las miosinas que proporcionarían la fuerza para mover los componentes dentro del citoplasma. Cuando se añaden microesferas de látex recubiertas con varios tipos de miosina a



(a) *Amoeba* 50 μm



(b) *Amoeba* englobando a su presa con los pseudópodos 50 μm

Figura 16.29 Movimiento ameboide. (**a**) Micrografía de *Amoeba proteus*, un protozoo que se mueve a través de la extensión de pseudopodos. (**b**) Esta micrografía muestra a una ameba usando sus pseudópodos para englobar una pequeña célula ciliada, de la que la ameba se alimenta por fagocitosis (LMs).

células de *Nitella* previamente lisadas, se observa que las esferas se mueven a lo largo de los filamentos de actina de una manera dependiente de ATP, en la misma dirección que se mueven los orgánulos.

La quimiotaxis es un movimiento direccional producido por un gradiente químico

Un aspecto clave de la migración de las células en el cuerpo y en los embriones es que es direccional. Una forma en la que ocurre la migración direccional, es a través de la formación de protrusiones predominantemente en un lado de la célula. En este caso, las células no sólo deben regular si forman protrusiones, sino dónde las forman. Las moléculas difusibles pueden ser claves para este tipo de migración direccional. El fenómeno por el que una célula se mueve hacia una concentración mayor o menor de una molécula difusible, se conoce como **quimiotaxis**. Las moléculas que producen esta respuesta se denominan quimioatrayentes (cuando la célula se mueve hacia concentraciones mayores de la molécula) o quimiorepelentes (si la célula se aleja de las concentraciones altas de la molécula). La quimiotaxis ha sido estudiada en detalle en los leucocitos de la sangre y en la ameba *Dyctiostelium*. En ambos casos el aumento de la concentración local de un quimioatrayente (pequeños péptidos en el caso de los leucocitos y AMP cíclico en el caso de *Dyctiostelium*) produce cambios profundos en el citoesqueleto de actina, que engloban cambios bioquímicos en las proteínas de unión a la actina y la migración de la célula hacia la fuente del quimioatrayente. Éstos tienen lugar mediante la activación local de receptores en la superficie celular para la sustancia quimioatrayente (o quimiorepelente). Los receptores son del tipo de los acoplados a proteínas G, que ya hemos analizado en el Capítulo 14. La forma en la que la activación de estos receptores estimula al citoesqueleto para formar protrusiones en la dirección de la migración, constituye en la actualidad, una excitante área de investigación.

Perspectiva

La motilidad es un proceso fundamental en la biología celular. Nuestro conocimiento de los mecanismos que subyacen a la motilidad de los organismos eucariotas se ha incrementado notablemente en la última década, y ya comprendemos que está dirigido en el nivel molecular por una serie de motores moleculares dependientes de ATP. Estas moléculas mueven los componentes celulares a lo largo del citoesqueleto, que constituyen una serie de pistas para llevar a dichos componentes a su lugar.

Se conocen dos sistemas principales de motilidad en los eucariotas, uno basado en la interacción de la dineína o la quinesina con los microtúbulos, y el otro basado en la interacción de la miosina con los filamentos de actina. Las quinesinas y las dineínas citoplásmicas son motores moleculares que transportan estructuras intracelulares en direcciones opuestas a lo largo de las pistas de los MTs. El axonema presente en cilios y flagelos es un ejemplo especializado de la interacción entre la tubulina y la dineína. Los nueve dobletes externos del axonema están conectados lateralmente uno a otro, y radialmente al par central de microtúbulos. Los brazos de dineína se proyectan desde un doblete de MTs al siguiente, deslizando un grupo de MTs sobre el siguiente. Existe una resistencia a este deslizamiento, que viene determinada por las espinas radiales entre los dobletes y el par central de microtúbulos, y por las uniones entre dobletes adyacentes. Como consecuencia, el deslizamiento se transforma en un incurvamiento.

La actina y la miosina se encuentran ampliamente distribuidas en las células no musculares, donde participan en varios tipos de movimientos como la reptación de las células, el movimiento ameboide, las corrientes citoplasmáticas y la citoquinesis. La contracción del músculo esquelético constituye un ejemplo especializado de esta motilidad. La contracción muscular supone el deslizamiento progresivo de los filamentos finos de actina sobre los filamentos gruesos de miosina, que está gobernado por la interacción entre la cabeza ATP-asa de las moléculas de miosina y sitios de unión a los filamentos de actina. La contracción se desencadena tras de la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico y finaliza cuando se bombea activamente el calcio de vuelta al SR. En el músculo esquelético, el calcio se une a la troponina y produce un cambio conformacional en la tropomiosina, que deja libre los sitios de unión entre la miosina y los filamentos finos. En el músculo liso, el efecto del calcio está mediado a través de la calmodulina, que activa la quinasa de la cadena ligera de la miosina que, finalmente, fosforila a su sustrato.

Las células que reptan representan un ejemplo llamativo de la motilidad basada en actina. Durante el reptado, la polimerización de la actina produce la extensión de las protrusiones celulares; la unión de las protrusiones al sustrato y la contracción de la célula, producen su avance.

El movimiento ameboide, en el que tienen lugar ciclos de gelificación y solificación, a medida que se extienden los pseudópodos, es otro tipo de movimiento mediado por actina, al igual que el movimiento de partículas dentro de la célula, como la ciclosis de las células vegetales y las algas, y las corrientes citoplasmáticas.

Problemas

Los problemas de mayor dificultad están marcados con un •.

16.1 Tríada de Kartagener. La esterilidad en hombres con la tríada de Kartagener se debe a que los espermatozoides no pueden moverse. El análisis citológico de los espermatozoides de dichos individuos revela que a sus colas (es decir, sus flagelos) les falta uno o más de sus componentes estructurales normales. Dichos individuos pueden sufrir enfermedades del tracto respiratorio, particularmente bronquitis y sinusitis recurrente, que está provocado por su incapacidad de limpiar el moco de sus pulmones y senos.

(a) ¿Cuál es el mecanismo que explica la inmovilidad de los espermatozoides en dichos casos de esterilidad?

(b) ¿Por qué la disfunción respiratoria está asociada con la esterilidad en los individuos afectados?

16.2 Una experiencia móvil. Indica cuál de las siguientes afirmaciones es verdadera para el sistema móvil que se utiliza para elevar el brazo (A), para provocar el latido del corazón (C), para mover la comida ingerida a través del intestino (I) o para barrer el moco y los detritos del tracto respiratorio (R). Puede haber más de una respuesta correcta en algún caso.

(a) Depende de los músculos que tienen una apariencia estriada cuando se examinan con un microscopio electrónico.

(b) Se vería probablemente afectado por las mismas drogas que inhiben la motilidad en un protozoo flagelado.

(c) Requiere ATP.

(d) Implica una señal de calcio mediada por la calmodulina.

(e) Supone la interacción entre los filamentos de miosina y actina.

(f) Muestra una fuerte dependencia energética de la oxidación de los ácidos grasos.

(g) Está bajo el control del sistema nervioso voluntario.

16.3 Estructura del músculo. El músculo esquelético de la rana está formado por filamentos gruesos con una longitud aproximada de 1,6 μm y filamentos finos de 1 μm de largo.

(a) ¿Cuál es la longitud de la banda A y de la banda I en un músculo con una longitud del sarcómero de 3,2 μm? Describe qué le sucede a la longitud de ambas bandas cuando la longitud del sarcómero disminuye de 3,2 a 2,0 μm.

(b) La zona H es una zona específica de la banda A. Si la longitud de la zona H de cada banda A disminuye de 1,2 a 0 μm a medida que la longitud del sarcómero pasa de 3,2 a 2,0 μm, ¿qué se puede deducir del significado físico de la zona H?

(c) ¿Qué se puede decir de la distancia desde el disco Z al límite de la zona H durante la contracción?

16.4 Rigor mortis y el ciclo de contracción. En la muerte, los músculos del cuerpo se vuelven rígidos e inextensibles, y se dice que el cadáver ha entrado en rigor.

(a) Explique los fundamentos del rigor. ¿En qué parte del ciclo de contracción se detiene el músculo? ¿Por qué?

(b) ¿En qué situación se entraría más rápidamente en rigor, si la muerte sobreviene yendo presurosamente a clase o sentado leyendo?

(c) ¿Qué efecto piensa que tendría la adición de ATP a los músculos en rigor?

•**16.5 AMPPCP y el ciclo de contracción**. AMPPCP es la abreviación de un análogo estructural del ATP en el que el tercer grupo fosfato está unido al segundo por un grupo CH_2 en vez de por un átomo de oxígeno. AMPPCP se une al sitio de unión al ATP de casi todas las ATP-asas, incluida la miosina. Sin embargo, a diferencia del ATP su grupo fosfato no puede eliminarse por hidrólisis. Cuando se aíslan miofibrillas y se colocan en un frasco que tiene iones de calcio y AMPPCP, la contracción se detiene rápidamente.

(a) ¿En qué fase del ciclo se detendrá la contracción con el AMPPCP? Dibuje la conformación de los filamentos finos, filamentos gruesos y los puentes de cruzamiento en la configuración detenida.

(b) ¿Piensa que la contracción volvería a producirse si se añade ATP al frasco con las miofibrillas detenidas por el AMPPCP? Explique por qué.

(c) ¿Qué otros procesos pueden verse inhibidos por AMPPCP en el músculo?

16.6 Atraído en dos direcciones. La zona H se encuentra en la mitad de los sarcómeros del músculo esquelético, flanqueada por un disco Z a cada lado. Los discos Z de cada lado se desplazan en dirección contraria hacia la zona H durante la contracción. Sin embargo, la miosina sólo puede avanzar en una dirección a lo largo de los filamentos finos. ¿Cómo se pueden conciliar los movimientos de los discos Z en direcciones contrarias con el movimiento unidireccional de la miosina a lo largo del filamento de actina?

16.7 Tic nervioso. Durante el transcurso de conflictos bélicos recientes, se ha discutido sobre las «armas de destrucción masiva», incluyendo los gases nerviosos. Uno de estos gases contiene el agente químico sarin. El sarin inhibe la recaptura del neurotransmisor acetilcolina. ¿Qué efecto esperaría que tuviese el gas sarin sobre la función muscular de los individuos expuestos al gas nervioso, y por qué? Detalle en su respuesta cómo afectaría el gas sarin a la unión neuromuscular, y qué efecto tendría sobre la señalización y los procesos en el citoesqueleto de los músculos afectados.

•**16.8 Viendo manchas.** En una técnica de microscopía conocida como fotoactivación fluorescente, se inyectan a las células monómeros (como la actina G) unidos a fluoresceína «enjaulada», que no puede emitir fluorescencia ya que está modificada covalentemente. Los monómeros inyectados polimerizan formando los componentes del citoesqueleto, y después se puede irradiar un punto con un rayo ultravioleta para «desenjaular» a la fluoresceína. Esto hace que el polímero se vea como una mancha fluorescente cuyos movimientos pueden seguirse utilizando microscopía computerizada. Asumamos que sólo los polímeros ensamblados pueden generar suficiente señal como para ser vistos en un microscopio de fluorescencia. Si se inyecta un fibroblasto en migración con

actina fluorescente «enjaulada», describa cómo sería el movimiento de la actina si ésta se desenjaulara, en los siguientes lugares y bajo las siguientes condiciones.

(a) En el extremo guía de un fibroblasto en migración que se ha soltado del sustrato.

(b) En el extremo guía de un fibroblasto en migración justo después del tratamiento con citocalasina.

(c) En el extremo guía de un fibroblasto que migra sobre un sustrato rico en fibronectina.

16.9 Popurrí de motilidad. Conteste de la manera más concisa posible, a las siguientes preguntas.

(a) Los *melanóforos* son células de los teleósteos rellenas de gránulos de pigmentos que se usan para controlar la coloración. Cuando los gránulos se agregan, las células tienen una apariencia clara; cuando los gránulos de pigmento se dispersan, la célula se oscurece. El movimiento de los gránulos está bajo control hormonal. ¿Cómo podría aseverar que la distribución y el movimiento de los gránulos es un ejemplo de movimiento basado en microtúbulos?

(b) Las fibras de estrés de las células no musculares contienen haces contráctiles de actina y de miosina II. Para que las fibras de estrés puedan contraerse y generar tensión, ¿cómo tienen que estar orientadas la miosina y la actina dentro de la fibra?

(c) El batido del flagelo del espermatozoide está determinado por el control preciso del lugar y el momento en los que la dineína ejerce una fuerza sobre los microtúbulos. Explique la razón de esto e indique qué sucedería si todas las moléculas de dineína estuvieran ejerciendo fuerza al mismo tiempo.

Bibliografía recomendada

Las referencias con importancia histórica están marcadas con •.

Referencias generales

Bray, D. *Cell Movements: From Molecules to Motility*, 2nd ed. New York: Garland, 2001.

Schliwa, M. y G. Woehlke. Molecular motors. *Nature* 422 (2003): 759-765.

Stossel, T. P. The machinery of cell crawling. *Sci. Amer.* 271 (September 1994): 54-63.

Vale, R. D. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112 (2003): 467-480.

Motilidad basada en microtúbulos

Allan, V. J., H. M. Thompson y M. A. McNiven. Motoring around the Golgi. *Nature Cell Biology* 4 (2002): E236-E242.

Asai, D. J. y M. P. Koonce. The dynein heavy chain: Structure, mechanics and evolution. *Trends Cell Biol.* 11 (2001): 196.

•Brokaw, C. J., D. J. L. Luck, and B. Huang. Analysis of the movement of *Chlamydomonas* flagella: The function of the radial-spoke system is revealed by comparison of wild-type and mutant flagella. *J. Cell Biol.* 92 (1982): 722.

Endow, S.A. Kinesin motors as molecular machines. *BioEssays* 25 (2003): 1212-1219.

•Goodenough, U. W. y J. E. Heuser. Substructure of the outer dynein arm. *J. Cell Biol.* 95 (1982): 795.

•Grigg, G. Discovery of the 9 + 2 subfibrillar structure of flagella/cilia. *BioEssays* 13 (1991): 363.

Hirokawa, N. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* (1998) 279: 519.

Ibanez-Tallon, I., N. Heintz y H. Omran. To beat or not to beat: roles of cilia in development and disease. *Hum. Mol. Genet.* 12 (2003): R27-R35.

Karki, S. y E. L. Holzbaur. Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11 (1999): 45.

Porter, M. E. Axonemal dyneins: assembly, organization, and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8 (1996): 10-17.

•Satir, P. How cilia move. *Sci. Amer.* 231 (October 1974): 44.

Scholey, J. M. Intraflagellar Transport. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19 (2003): 423-443.

Movimiento basado en los filamentos en el músculo

•Franzini-Armstrong, C. y L. D. Peachey. Striated muscles: Contractile and control mechanisms. *J. Cell Biol.* 91 (1981): 166.

Geeves, M. A. y K. C. Holmes. Structural mechanism of muscle contraction. *Annu. Rev. Biochem.* 68 (1999): 687.

•Huxley, A. F. *Reflections on Muscle.* Princeton, NJ: Princeton University Press, 1980.

•Huxley, H. E. The mechanism of muscular contraction. *Science* 164 (1969): 1356.

•Maruyama, K. Birth of the sliding filament concept in muscle contraction. *J. Biochem.* 117 (1995): 1.

Reedy, M. C. Visualizing myosin's power stroke in muscle contraction. *J. Cell Sci.* 113 (2000): 3551.

Spudich, J. A. The myosin swinging cross-bridge model. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (2001): 387-392.

Squire, J. M. Architecture and function in the muscle sarcomere. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7 (1997): 247.

Movimiento no muscular basado en los microfilamentos

Heidemann S. R. y R. E. Buxbaum. Cell crawling: First the motor, now the transmission. *J. Cell Biol.* 141 (1998): 1.

Iijima, M., Y. E. Huang y P. Devreotes. Temporal and spatial regulation of chemotaxis. *Dev. Cell* 3 (2002): 469-478.

Kamm, K. E. y J. T. Stull. Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J. Biol. Chem.* 276 (2001): 4527-4530.

Lauffenburger, D. A. y A. F. Horwitz. Cell migration: A physically integrated molecular process. *Cell* 84 (1996): 359.

Mermall, V., P. L. Post y M. S. Mooseker. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science* 279 (1998): 527.

•Taylor, D. L. y J. S. Condeelis. Cytoplasmic structure and contractility in amoeboid cells. *Int. Rev. Cytol.* 56 (1979): 57.

Welch, M. D., A. Mallavarapu, J. Rosenblatt y T. J. Mitchison. Actin dynamics in vivo. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9 (1997): 54.

17

Más allá de la célula: estructuras extracelulares, adhesion y uniones celulares

En capítulos precedentes, hemos tratado a las células como si existieran aisladamente y como si «terminaran» en la membrana plasmática. Sin embargo, muchas tipos celulares —incluyendo la mayoría de las de nuestro propio cuerpo— pasan toda su vida unidas a células vecinas. Además, casi todas las células tienen algún tipo de estructura externamente a la membrana plasmática pero que, no obstante, es una parte integral de la célula, tanto estructural como funcionalmente. Estas *estructuras extracelulares* se componen principalmente de macromoléculas que son secretadas por la célula. La naturaleza química de las macromoléculas difiere entre organismos, pero las estructuras extracelulares de la mayoría de eucariotas tienen algo en común: contienen fibras largas y flexibles embebidas en una matriz amorfa e hidratada de moléculas ramificadas que generalmente son glicoproteínas o polisacáridos.

Las células animales tienen una *matriz extracelular* que adopta una gran variedad de formas y desempeña papeles importantes en procesos celulares tan diversos como división, motilidad, diferenciación y adhesión. En plantas, hongos, algas y procariotas, las estructuras extracelulares se denominan *pared celular*, aunque su composición química difiere considerablemente entre estos organismos. Las paredes celulares confieren rigidez a las células a las que recubren, sirven como barrera de permeabilidad y protegen a las células de daños físicos y del ataque de virus y organismos infecciosos.

En este capítulo centraremos nuestra atención fundamentalmente en la matriz extracelular, la adhesión de las células entre sí y a la matriz extracelular, y los diversos tipos de uniones que conectan células adyacentes en los tejidos multicelulares. Después hablaremos de la pared que rodea a las células vegetales y de las estructuras especializadas que permiten la comunicación célula a célula de modo directo entre células vecinas, a pesar de la presencia de la pared. En cada caso, nos centraremos en las moléculas involucradas y su contribución en las propiedades estructurales y funcionales de las células.

La matriz extracelular de los animales

La **matriz extracelular (ECM)** de las células animales adopta una variedad de formas notable en diferentes tejidos. La Figura 17.1 ilustra sólo tres ejemplos. El *hueso* se compone en gran parte de una matriz extracelular que contiene un pequeño número de células esparcidas. El *cartílago* es otro tejido construido casi completamente de materiales de la matriz, aunque ésta es mucho más flexible que en el hueso. A diferencia del hueso y el cartílago, el *tejido conjuntivo* que rodea a las glándulas y los vasos sanguíneos tiene una matriz celular relativamente gelatinosa que contiene numerosos fibroblastos entremezclados.

Estos ejemplos ilustran el papel que la ECM juega, determinando la forma y las propiedades mecánicas de órganos y tejidos. Sin embargo, la matriz no sólo proporciona soporte estructural; también influye en propiedades tales como la extensibilidad del tejido, la forma y el movimiento celular, y el desarrollo de características celulares especializadas.

A pesar de esta diversidad de funciones, la ECM de las células animales se compone casi siempre de las tres mismas clases de moléculas: (1) proteínas estructurales como *colágenos* y *elastinas*, que aportan resistencia y flexibilidad a la matriz; (2) complejos proteína-polisacárido denomi-

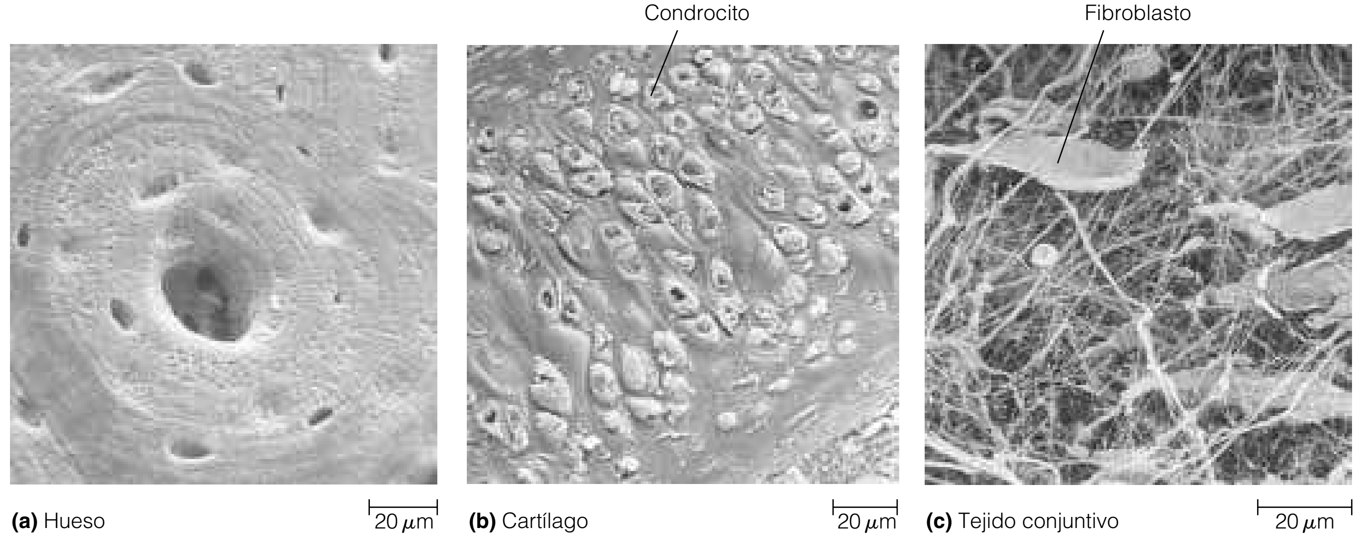


Figura 17.1 Diferentes clases de matriz extracelular. La ECM adopta distintas formas en diferentes tejidos, como ilustran estas imágenes de SEMs. (**a**) En el tejido óseo, una ECM dura y calcificada se establece en anillos concéntricos alrededor de canales centrales. Las pequeñas depresiones elípticas son regiones en las que se encuentran los osteocitos. (**b**) En el cartílago, las células están embebidas en una matriz flexible compuesta por grandes cantidades de proteoglicanos. (**c**) En el tejido conectivo que se encuentra debajo de la piel, los fibroblastos están rodeados por una ECM que contiene grandes cantidades de fibras de colágeno.

nados *proteoglicanos* que constituyen la matriz en la que se insertan las moléculas estructurales; y (3) glicoproteínas de adhesión, tales como las *fibronectinas* y las *lamininas*, que anclan las células a la matriz (Tabla 17.1). La considerable variedad de propiedades de la ECM en distintos tejidos se debe no sólo a diferencias en los tipos de proteínas estructurales y proteoglicanos presentes, sino también a variaciones en la proporción entre proteínas estructurales —colágeno, sobre todo— y proteoglicanos, y a las clases y cantidades de glicoproteínas de adhesión presentes. Consideraremos por partes cada uno de los componenetes de la ECM.

Los colágenos son responsables de la resistencia de la matriz extracelular

El componente más abundante de la ECM en animales es una gran familia de proteínas íntimamente relacionadas denominadas **colágenos**, que forman fibras con gran resistencia a la tracción lo cual explica, en gran medida, la resistencia de la ECM. El colágeno es la proteína más abundante en vertebrados, y representa globalmente más del 25-30% de las proteínas totales del cuerpo. El colágeno es secretado por varios tipos de células del tejido conectivo, incluyendo los *fibroblastos*. Sin colágeno, las células en éstos y otros tejidos no tendrían la suficiente fuerza adhesiva para mantener una forma dada.

Existen dos características descriptivas que comparten todas las fibras de colágeno: su existencia como una *triple hélice* rígida de tres cadenas de polipéptidos entrelazadas y su composición inusual de aminoácidos. Específicamente, el colágeno posee un alto contenido en un aminoácido común como es la glicina y en aminoácidos menos comunes como son la hidroxilisina y la hidroxiprolina, los cuales rara vez están presentes en otras proteínas (*véase* Figura 7.25c, para las estructuras de hidroxilisina e hidroxiprolina). El alto contenido en glicina posibilita la triple hélice porque el espaciado de los residuos de glicina los sitúa en los ejes de la hélice, y la glicina es el único aminoácido lo suficientemente pequeño como para poder situarse en el interior de una triple hélice.

En la mayoría de tejidos animales se pueden observar **fibras de colágeno** mediante microscopía electrónica de barrido como haces a través de la matriz extracelular (Figura

Tabla 17.1 Estructuras extracelulares de las células eucarióticas

Clase de organismo	Estructura extracelular	Fibra estructural	Componentes de la matriz hidratada	Moléculas adhesivas
Animales	Matriz extracelular (ECM)	Colágenos y elastinas	Proteoglicanos	Fibronectinas y lamininas
Vegetales	Pared celular	Celulosa	Hemicelulosas y extensinas	Pectinas

17.2a). Una de las características más destacable de las fibras de colágeno es su enorme resistencia física. Por ejemplo, es necesaria una carga de más 20 libras (alrededor de 9 kg) para romper unas fibra de colágeno de únicamente 1 milímetro de diámetro. No es sorprendente, que el colágeno sea responsable en gran medida de la resistencia mecánica de tejidos protectores y de soporte tales como la piel, el hueso, los tendones y el cartílago. Como se ilustra en la Figura 17.2b, cada fibra de colágeno está compuesta por numerosas *fibrillas*. Una fibrilla, a su vez, está formada por muchas moléculas de colágeno, cada una de las cuales se compone de tres cadenas polipeptídicas denominados *cadenas* α que se enrollan formando una triple hélice rígida y dextrógira (Figura 17.2c y d). Las moléculas de colágeno tienen alrededor de 270 nm de longitud y 1,5 nm de diámetro y están alineadas paralelamente, una detrás de otra, dentro de las fibrillas. Una fibra de colágeno típica tiene alrededor de 270 moléculas de colágeno en sección transversal.

Un precursor denominado procolágeno forma muchos tipos de colágeno tejido-específicos

Dada la complejidad de una fibra de colágeno, es importante preguntarse cómo se genera una estructura tan elaborada (Figura 17.3). En el lumen del retículo endoplasmático (ER), se ensamblan tres cadenas α para formar una triple hélice denominada **procolágeno.** La presencia de secuencias cortas no-helicoidales de aminoácidos en ambos extremos de la estructura triple-helicoidal previene la formación de fibrillas de colágeno mientras el procolágeno permanece dentro de la célula. Una vez que el procolágeno se secreta desde la célula al espacio intercelular, se convierte en colágeno por la *procolágeno peptidasa,* una enzima que elimina los aminoácidos sobrantes tanto del extremo N- como C-terminal de la triple hélice. Las moléculas de colágeno resultantes se asocian espontáneamente para formar fibrillas de colágeno maduras, que posteriormente se ensamblan paralelamente formando fibras.

La estabilidad de las fibrillas de colágeno se refuerza por puentes de hidrógeno que se establecen entre los grupos hidroxilo de los residuos de hidroxiprolina e hidroxilisina de las cadenas α. Estos puentes de hidrógeno forman enlaces cruzados tanto dentro como entre las moléculas individuales de colágeno de una fibrilla. Además, es frecuente encontrar tipos especializados de colágeno en la superficie de las fibrillas de colágeno. La estructura triple helicoidal de estos colágenos especializados se interrumpe a intervalos, permitiendo a las moléculas doblarse y servir así como puentes flexibles entre fibrillas de colágeno adyacentes o entre fibrillas de colágeno y otros componentes de la matriz.

Los vertebrados tienen alrededor de 25 clases distintas de cadenas α, cada una de las cuales está codificada por su correspondiente gen y posee su propia secuencia de aminoácidos. Estas cadenas α distintas se combinan de diversas

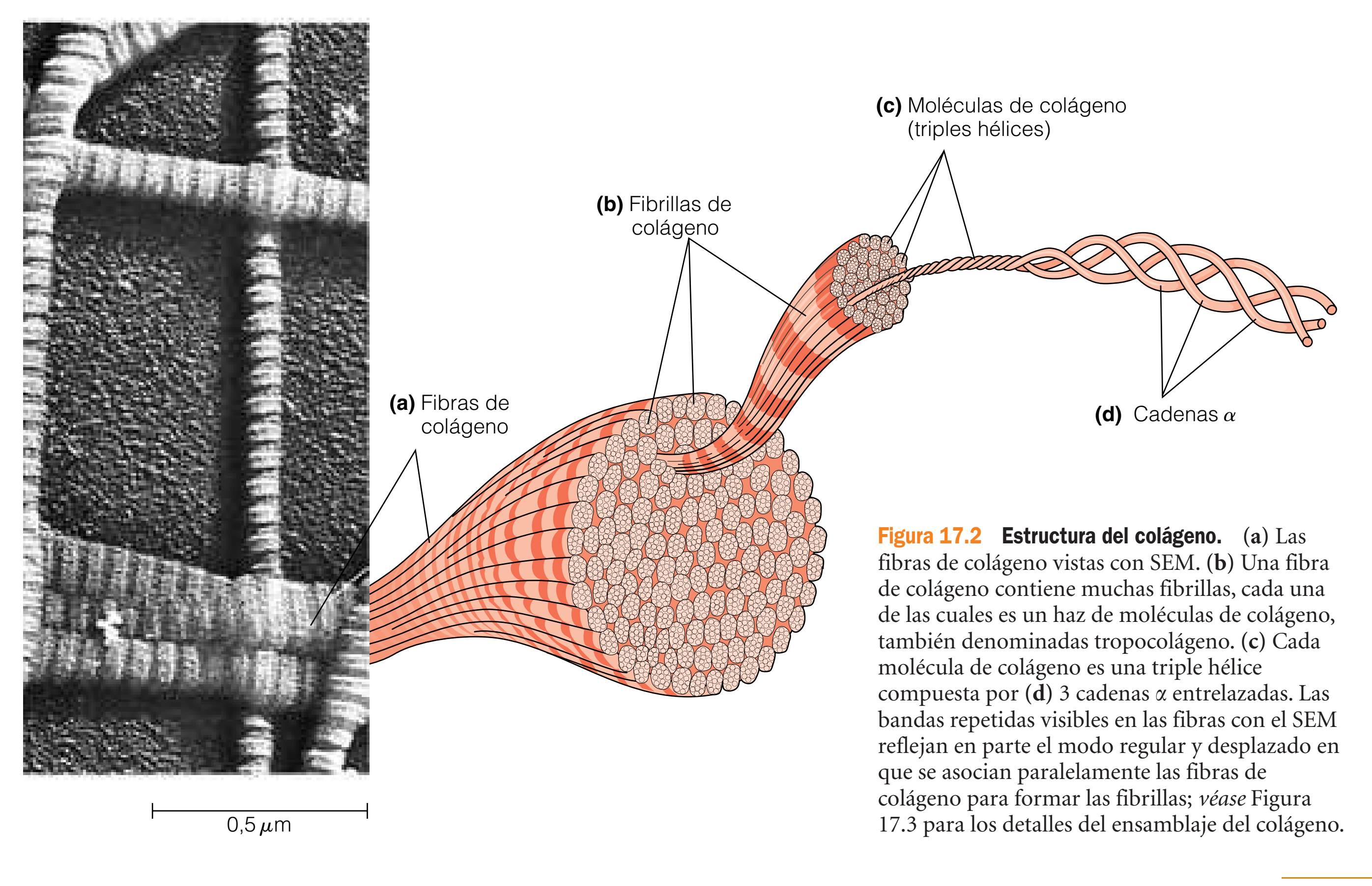


Figura 17.2 Estructura del colágeno. (**a**) Las fibras de colágeno vistas con SEM. (**b**) Una fibra de colágeno contiene muchas fibrillas, cada una de las cuales es un haz de moléculas de colágeno, también denominadas tropocolágeno. (**c**) Cada molécula de colágeno es una triple hélice compuesta por (**d**) 3 cadenas α entrelazadas. Las bandas repetidas visibles en las fibras con el SEM reflejan en parte el modo regular y desplazado en que se asocian paralelamente las fibras de colágeno para formar las fibrillas; *véase* Figura 17.3 para los detalles del ensamblaje del colágeno.

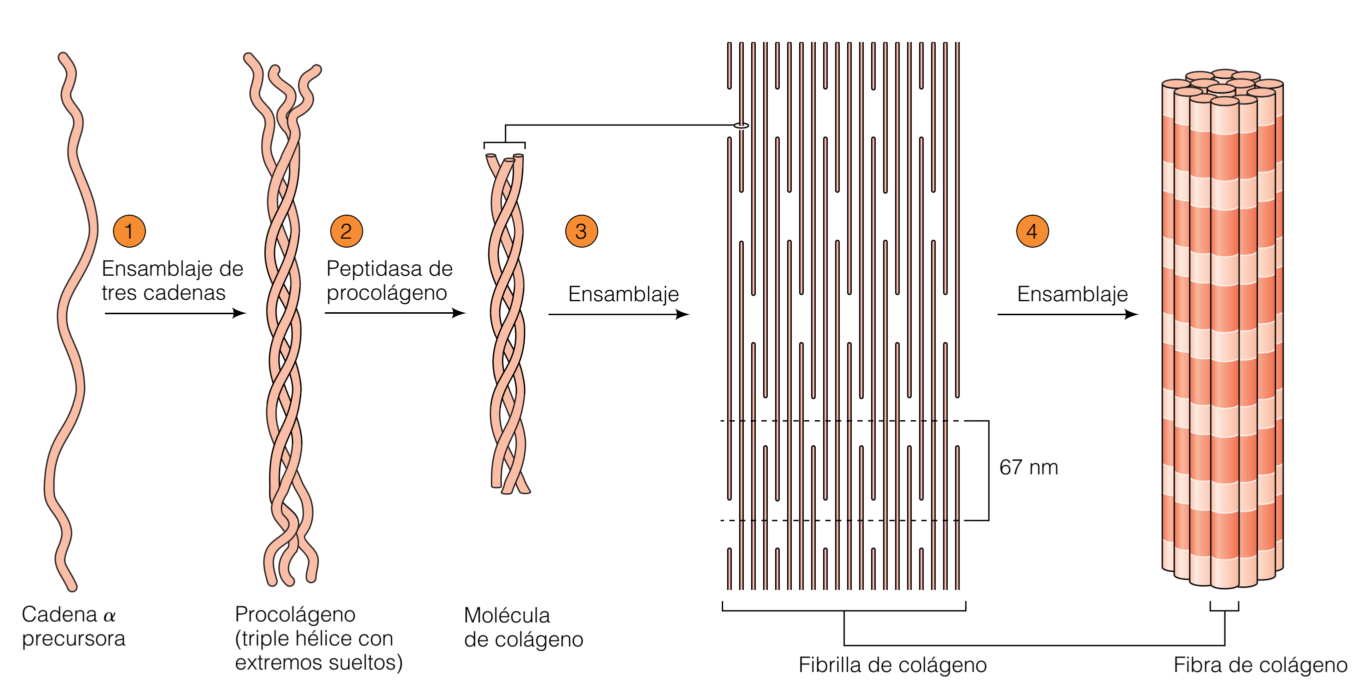


Figura 17.3 Ensamblaje de colágeno. ① Las cadenas precursoras de colágeno se ensamblan en el lumen del ER para formar moléculas de procolágeno triple helicoidales. ② Después de ser secretado por la célula, el procolágeno se convierte en colágeno por una reacción de escisión peptídica catalizada por la enzima peptidasa de procolágeno. ③ Después, las moléculas de colágeno, también denominadas tropocolágeno, se unen entre sí y se autoensamblan dando lugar a fibrillas de colágeno. ④ Las fibrillas se ensamblan paralelamente formando fibras de colágeno. En el colágeno estriado, la distancia de repetición de 67 nm se crea empaquetando de filas de moléculas de colágeno, estando cada fila desplazada un cuarto de la longitud de una molécula individual.

maneras para formar 15 tipos diferentes de moléculas de colágeno, la mayoría de las cuales se encuentran en tejidos específicos. La Tabla 17.2 enumera los distintos tipos y los tejidos donde se encuentran. Los tipos I, II y III son las formas más abundantes; solamente el tipo I supone más del 90% del colágeno de todo el cuerpo humano.

Cuando las fibrillas que contienen las moléculas de colágeno tipo I, II, III o V se examinan con un microscopio electrónico, exhiben un patrón característico de bandas oscuras transversales, o *estriaciones*, que se repiten a intervalos de alrededor de 67 nm (*véase* Figura 17.2a). Estas bandas reflejan que las triples hélices se asocian paralelamente de modo regular para formar fibrillas pero con cierto desplazamiento (*véase* Figura 17.3, ③). El colágeno tipo IV forma fibrillas muy finas y sin estriación. Las estructuras de otros tipos de colágeno no están tan bien caracterizadas.

Tabla 17.2 Tipos de colágenos, su localización y su estructura

Tipo de estructura	Tipo(s) de colágeno	Tejidos representativos
Fibrillas largas	I, II, III, V, XI	Piel, hueso, tendón, cartílago, músculo
Asociado a fibrillas, con triples hélices interrumpidas	IX, XII, XIV	Cartílago, piel embrionaria y tendón
Asociado a fibrillas, forma filamentos arrosariados	VI	Tejidos intersticiales
Láminas	IV, VIII, X	Lámina basal, placas de crecimiento de cartílago
Fibrillas de anclaje	VII	Epitelio
Transmembrana	XVII	Piel (XVII)
Otras	XIII, XV, XVI, XVIII, XIX	Membranas basales, tejidos variados

Las elastinas aportan elasticidad y flexibilidad a la matriz extracelular

Aunque las fibras de colágeno aportan gran resistencia a la tracción a la ECM, su estructura rígida y en forma de barra no es especialmente compatible con la elasticidad y flexibilidad requerida por algunos tipos de tejidos. Por ejemplo, el tejido pulmonar deber expandirse y contraerse cuando un organismo respira, y las arterias deben ser capaces de dilatarse y constreñirse cuando el corazón bombea sangre a través de ellas. Otros tejidos que requieren una ECM flexible son la piel y los intestinos, que cambian de forma continuamente. Las fibras elásticas presentes en la ECM son extensibles y aportan elasticidad. El principal componente de las fibras elásticas es una familia de proteínas de la ECM denominadas **elastinas**. Al igual que el colágeno, las elastinas son ricas en los aminoácidos glicina y prolina. Sin embargo, los residuos de prolina no están hidroxilados y no presentan hidroxilisina. Las moléculas de elastina se unen entre sí por enlaces cruzados covalentes entre los residuos de lisina. La tensión ejercida sobre la red de elastina provoca que las moléculas individuales adopten conformaciones extendidas que permiten a la red estirarse en su conjunto (Figura 17.4a). Cuando la tensión cesa, las moléculas individuales se relajan, y retornan a su conformación normal, menos extendida. Las uniones cruzadas entre moléculas, por tanto, permiten a la red volver a su forma original (Figura 17.4b).

Las importantes funciones de los colágenos y las elastinas se demuestran claramente en el envejecimiento. A lo largo del tiempo, los colágenos aumentan el número de uniones y se hacen más inflexibles, y las elastinas se van perdiendo en tejidos como la piel. Como resultado, las personas más mayores suelen tener huesos y articulaciones menos flexibles, su piel se arruga y retorna a su forma original de modo muy lento tras ser deformada (por un leve pellizco, por ejemplo).

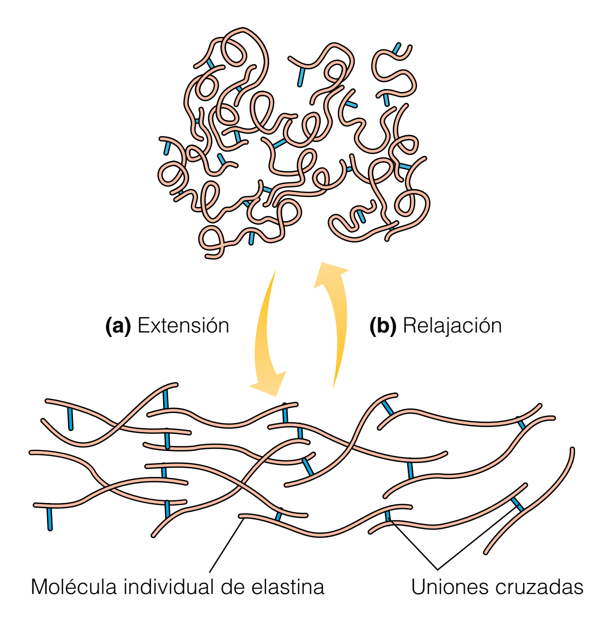


Figura 17.4 Extensión y retracción de las fibras de elastina. Cada molécula de elastina en la red entrelazada puede asumir tanto una configuración extendida (abajo) o compacta (arriba). La fibra (**a**) se estira a su forma extendida cuando se ejerce tensión sobre ella, y (**b**) retrocede a su forma compacta cuando la tensión cesa.

Las fibras de colágenos y elastinas se encuentran embebidas en un matriz de proteoglicanos

La matriz hidratada y viscosa de la ECM, en la que están inmersas las fibrillas de colágeno y elastina, está compuesta principalmente por **proteoglicanos**, glicoproteínas en las que se unen un gran número de **glicosaminoglicanos (GAGs)** a una molécula de proteína única.

Los GAGs se caracterizan por poseer unidades repetidas de disacáridos, como se ilustra en la Figura 17.5 para los tres tipos más comunes, *condroitín sulfato, queratán sulfato e hialuronato*. En todos los casos, uno de los dos azúcares de las unidades repetidas de disacárido es un azúcar amino, o bien *N-acetilglucosamina (GlcNAc)* o *N-acetilgalactosamina (GalNAc)*. El otro azúcar de las unidades repetidas de disacárido es generalmente un azúcar o un azúcar ácido, normalmente *galactosa (Gal)* o *glucouronato (GlcUA)*. En la mayoría de casos, el azúcar amino tiene unidos uno o más grupos sulfato; de las unidades repetidas de GAG mostradas en la Figura 17.5, solamente el hialuronato carece de grupos sulfato. Como los GAGs son moléculas hidrofílicas con muchos grupos carboxilo y sulfato cargados negativamente, atraen tanto agua como cationes, y por tanto, forman una matriz hidratada y gelatinosa en la que quedan embebidas las fibrillas de colágeno y elastina.

La mayoría de glicosaminoglicanos de la ECM están unidos covalentemente a moléculas proteicas para formar proteoglicanos. Todos los proteoglicanos están formados por numerosas cadenas de GAG unidas a lo largo de toda la longitud de un **núcleo proteico**, como se muestra en la Figura 17.5. Pueden formarse muchas clases distintas de proteoglicanos por combinación de distintos núcleos proteicos y GAGs de varios tipos y longitudes. Los proteoglicanos varían enormemente en tamaño, dependiendo del peso molecular del núcleo proteico (que varía desde 10.000 hasta más de 500.000) y del número y de la longitud de las cadenas de carbohidrato (1-200 por molécula, con una longitud media alrededor de las 800 unidades de monosacárido). La mayoría de proteoglicanos son enormes; tienen pesos moleculares en el rango de los 0,25-3 millones y un alto contenido en carbohidratos —por encima del 95%—. Los proteoglicanos se unen directamente a las fibras de colágeno para constituir la estructura de red fibrilar de la ECM.

En muchos tejidos, los proteoglicanos están presentes como moléculas individuales. En el cartílago, sin embargo, numerosos proteoglicanos se unen a largas moléculas de hialuronato, formando grandes complejos como se muestra en la Figura 17.5. Un único complejo puede tener un

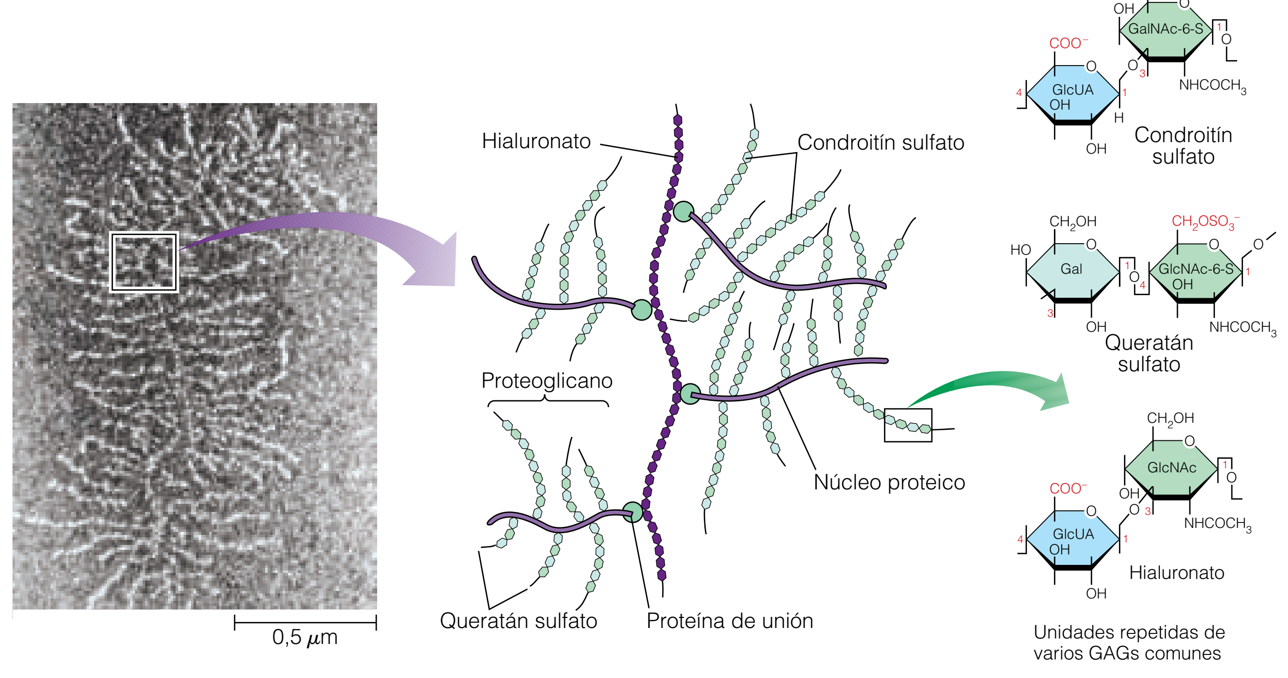


Figura 17.5 Estructura del proteoglicano en el cartílago. En el cartílago, muchos proteoglicanos se asocian con un eje de hialuronato para formar un complejo que es fácilmente visible con un microscopio electrónico. (Izquierda) Complejo hialuronato-proteoglicano aislado del cartílago bovino (TEM). (Centro) Diagrama de una pequeña porción de la estructura mostrando núcleos proteicos de proteoglicanos anclados por medio de proteínas de unión a una molécula larga de hialuronato. Las cadenas cortas de queratán sulfato y condroitín sulfato se unen covalentemente a lo largo de toda la longitud del núcleo de las proteínas. Los proteoglicanos tienen un contenido en carbohidratos cercano al 95%. (Derecha) Estructura de las unidades repetidas de disacáridos en glicosaminoglicanos (GAGs) extracelulares comunes que se encuentran en la matriz de las células animales. La unidad repetida de condroitín sulfato (arriba) se compone de glucuronato, la forma ionizada del ácido glucurónico (GlcUA) y N-acetilgalactosamina (GalNAc). El queratán sulfato (medio) tiene como unidad repetida galactosa (Gal) y N-acetilglucosamina (GlcNAc). El hialuronato (abajo) tiene una unidad repetida que consiste en GlcUA y GlcNAc.

peso molecular de varios millones y puede tener varias micras de longitud. La notable elasticidad y flexibilidad del cartílago se debe principalmente a las propiedades de estos complejos.

Una función importante de los proteoglicanos es atrapar las moléculas de agua. Realmente, las redes de proteoglicanos son como esponjas extracelulares que pueden retener enormes cantidades de agua, ¡más de 50 veces su peso! A causa de su gran contenido en agua, las redes de proteoglicanos son bastante resistentes a la compresión y recuperan rápidamente su forma si se deforman.

El hialuronato libre lubrica las articulaciones y facilita la migración celular

Aunque la mayoría de GAGs que se encuentran en la matriz extracelular existen solamente como componentes de proteoglicanos y no como glicosaminoglicanos libres, el hialuronato es una excepción. Además de su papel en el cartílago como columna vertebral de los complejos de proteoglicano, el hialuronato también está presente como molécula libre formada por cientos o incluso miles de unidades de disacáridos repetidas. Las moléculas de hialuronato tienen propiedades lubricantes y son más abundantes en lugares donde debe reducirse la fricción, como las articulaciones entre huesos.

Los proteoglicanos y las glicoproteínas adhesivas anclan las células a la matriz extracelular

Las células están unidas a la ECM mediante uniones de proteoglicanos. En algunos casos, los proteoglicanos son en sí mismos componentes integrales de la membrana plasmática, con su núcleo polipeptídico embebido en ella. En otros casos, los proteoglicanos se unen de manera covalente a los fosfolípidos de la membrana. Alternativamente, tanto los proteoglicanos como el colágeno pueden unirse a proteínas receptoras específicas situadas en la superficie externa de la membrana plasmática.

Las uniones directas entre la ECM y la membrana plasmática se refuerzan por una familia de *glicoproteínas de adhesión* que unen proteoglicanos y moléculas de colágeno entre sí y a los receptores situados sobre la superficie de la membrana. Estas proteínas tienen por lo general dominios múltiples, algunos con sitios de unión para macromoléculas de la ECM y otros con sitios de unión para receptores de

membrana. Las dos clases más comunes de glicoproteínas de adhesión son las *fibronectinas* y las *lamininas*. Muchos de los receptores de membrana a los que se unen las glicoproteínas pertenecen a una familia de proteínas transmembrana denominadas *integrinas*. En las siguientes secciones, hablaremos sobre las fibronectinas, lamininas e integrinas.

Las fibronectinas unen células a la ECM y guían el movimiento celular

Las **fibronectinas** son una familia de glicoproteínas de adhesión relacionadas estrechamente que se encuentran en la ECM y que se distribuyen ampliamente en el reino animal. Las fibronectinas se encuentran de forma soluble en la sangre y otros fluidos del cuerpo, como fibrillas insolubles en la matriz extracelular, y como una forma intermedia asociada de forma laxa a las superficies celulares. Las diferentes formas de la proteína se generan porque el RNA transcrito del gen de la fibronectina se procesa de varios modos para generar los mRNAs que codifican a las distintas proteínas.

Una molécula de fibronectina se compone de dos subunidades polipeptídicas muy largas que están unidas cerca de su extremo carboxilo por un par de enlaces disulfuro (Figura 17.6). Cada subunidad tiene alrededor de 2.500 aminoácidos y se pliega en una serie de dominios en forma de bastón conectados por segmentos cortos y flexibles de la cadena polipeptídica. Varios de los dominios reconocen y unen a una o más clases específicas de macromoléculas localizadas en la ECM o sobre la superficie celular, incluyendo varios tipos de colágeno (I, II y IV), heparina y la proteína de coagulación sanguínea, fibrina. Otros dominios reconocen y se unen a receptores de la superficie celular. La capacidad de estos dominios para la unión al receptor se ha localizado en una secuencia tripeptídica específica, RGD (arginina-glicina-aspartato). Esta *secuencia RGD* es un motivo común entre las proteínas de adhesión extracelulares y es reconocida por varias integrinas de la superficie celular (*véase* la siguiente sección).

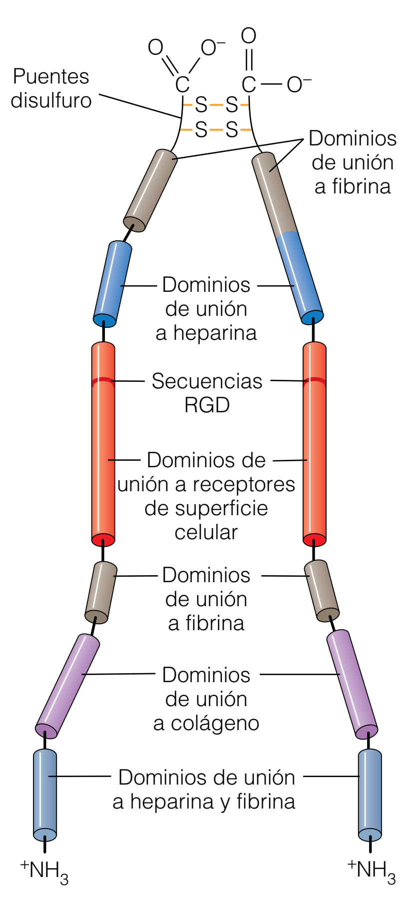
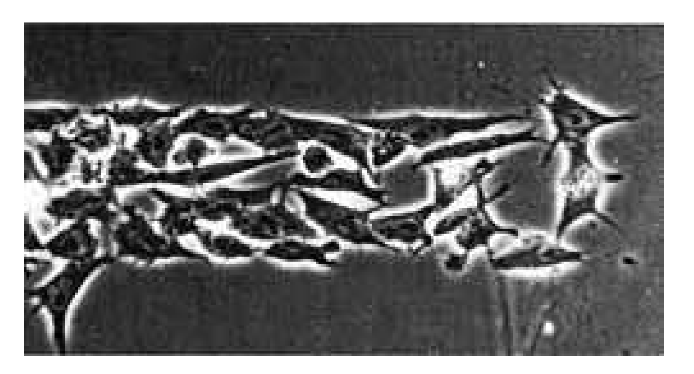


Figura 17.6 Estructura de la fibronectina. Una molécula de fibronectina se compone de dos cadenas casi idénticas de polipéptidos, unidas por dos puentes disulfuro cerca de sus extremos carboxi-terminales. Cada cadena de polipéptido se estructura en una serie de dominios globulares unidos por segmentos cortos y flexibles. Los dominios globulares tienen sitios de unión para los componentes de la ECM o para receptores específicos de la superficie celular. El dominio de unión a receptor contiene una secuencia tripeptídica RGD (arginina-glicina-aspartato), que es reconocida por los receptores de fibronectina. Además de las actividades de unión señaladas, la fibronectina también tiene sitios de unión para el heparán sulfato, el hialuronato y gangliósidos (glicoesfingolípidos que contienen grupos de ácido siálico).

Efectos de las fibronectinas en la forma y el movimiento celular. Las fibronectinas se unen a receptores de la superficie celular así como a componentes de la ECM tales como el colágeno y la heparina, y por tanto funcionan como moléculas puente que unen las células a la ECM. Este papel de anclaje se puede demostrar experimentalmente situando células en una placa de cultivo recubierta por fibronectina. Bajo estas condiciones, las células se unen a la superficie de la placa más eficazmente de lo que lo hacen en ausencia de fibronectina. Tras unirse, las células se aplanan (Figura 17.7a) y los componentes del citoesqueleto de actina se alinean con la fibronectina localizada fuera de la célula (Figura 17.7b y c). Como la orientación y organización de la red de actina del citoesqueleto son importantes en la determinación de la forma de la célula, la fibronectina es importante en el mantenimiento de la forma celular.

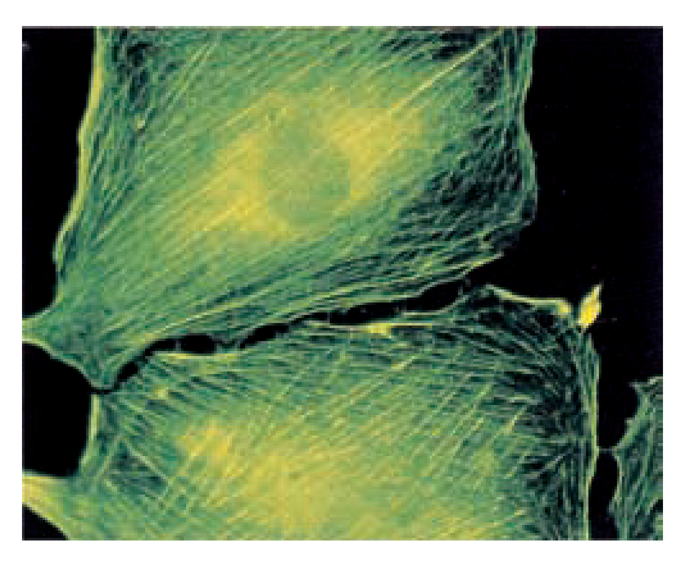
La fibronectina también está relacionada con el movimiento celular. Por ejemplo, cuando se hacer crecer células embrionarias migratorias sobre fibronectina, se adhieren fácilmente a ella (*véase* Figura 17.7a). Las vías seguidas por las células migratorias son ricas en fibronectina, sugiriendo que dichas células se guían por unión a moléculas de fibronectina a lo largo del camino. Se han obtenido apoyos experimentales a esta idea en estudios en los que se inyectaron anticuerpos dirigidos contra fibronectina a embriones de anfibios en desarrollo. La migración celular fue interrumpida, dando lugar al desarrollo de embriones anormales.

Se pueden obtener evidencias más directas de la importancia de la fibronectina en los embriones estudiando rato-

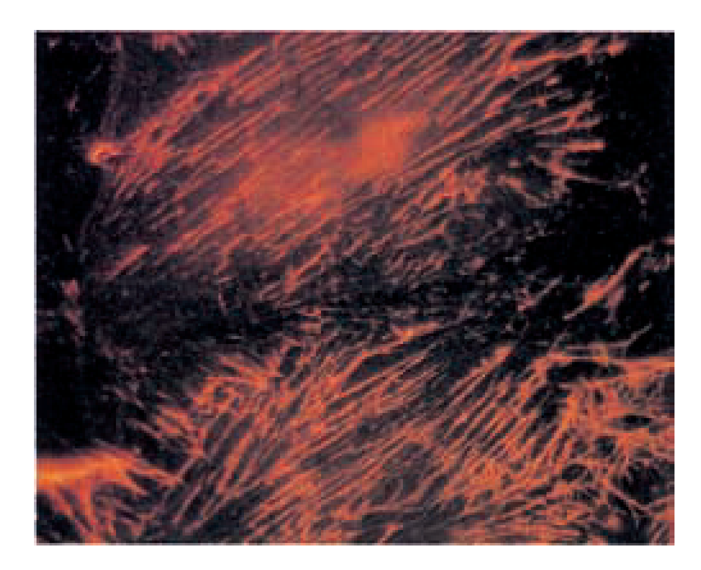


(a) Células de las crestas neurales

Figura 17.7 Influencia de la fibronectina en la forma y en la migración celular. (a) Las células de las crestas neurales (un tipo de células embrionarias migratorias) migran *in vitro* preferencialmente a lo largo de una franja de fibronectina. (b y c) Las micrografías fluorescentes muestran las mismas células en cultivo teñidas con anticuerpos específicos fluorescentes para actina (b) y para fibronectina (c). Observe que la red de fibronectina extracelular y los microfilamentos intracelulares de actina se alinean en un patrón similar (LMs).



(b) Actina



(c) Fibronectina

nes modificados genéticamente, incapaces de producir fibronectina. Estos ratones tienen defectos severos en las células que forman la musculatura corporal y en la vascularización. Estos defectos ponen de manifiesto la crucial importancia de la fibronectina durante el desarrollo embrionario.

La observación de que muchos tipos de células tumorales son incapaces de sintetizar fibronectina y presentan pérdida de la forma celular normal y desunión de la ECM sugiere una posible relación de la fibronectina con el cáncer. Si se aporta fibronectina a estas células, suelen volver a una forma más normal, recuperan su capacidad de unirse a la ECM y dejan de ser malignas.

Efectos de la fibronectina en la coagulación sanguínea. La forma soluble de la fibronectina presente en la sangre, denominada fibronectina plasmática, está relacionada con la coagulación sanguínea. La fibronectina promueve la coagulación sanguínea porque tiene varios dominios de unión que reconocen a la fibrina, proteína de la coagulación sanguínea, y puede unir plaquetas sanguíneas a la fibrina cuando se forma el coágulo.

Las lamininas unen células a la lámina basal

Otra importante glicoproteína de adhesión presente en la ECM es una familia de proteínas denominadas lamininas. A diferencia de las fibronectinas que se encuentran distribuidas ampliamente en los tejidos de soporte y fluidos corporales, las lamininas se encuentran principalmente en la lámina basal, la delgada capa de material extracelular especializado, generalmente de unos 50 nm de espesor, que se sitúa por debajo de las células epiteliales, y que por tanto, las separa del tejido conectivo (Figura 17.8). Además, la lámina basal rodea a las células musculares, los adipocitos y las células de Schwann que forman las envueltas de mielina alrededor de las células nerviosas.

Propiedades de la lámina basal. La lámina basal sirve como soporte estructural que mantiene la organización del tejido y como barrera permeable que regula el movimiento de moléculas y células. En el riñón, por ejemplo, la lámina basal funciona como un filtro que permite el paso de moléculas pequeñas pero no el movimiento de proteínas sanguíneas desde la sangre a la orina. La lámina basal situada

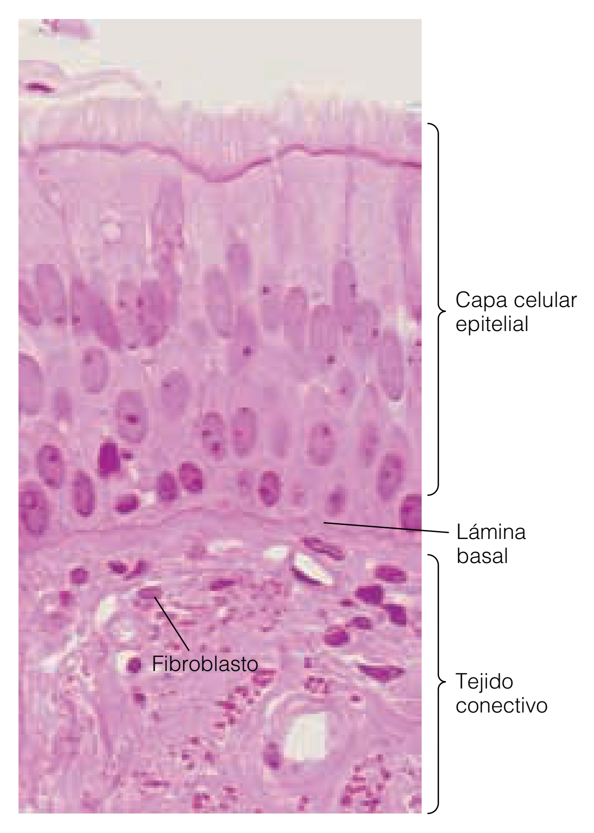


Figura 17.8 La lámina basal. La lámina basal es una delgada capa, generalmente de unos 50 nm, de materiales de la matriz que separa una capa celular epitelial del tejido conectivo subyacente (TEM).

por debajo de las células epiteliales previene el paso de células del tejido conectivo subyacente al epitelio, pero permite la migración de glóbulos blancos necesarios para combatir infecciones. El efecto de la lámina basal en la migración celular es especialmente interesante ya que algunas células tumorales muestran una unión a la lámina basal mayor de la normal. El aumento resultante en la capacidad de las células tumorales para unirse a la lámina basal puede facilitar su movimiento a través de ella y permitirles migrar de unas regiones del cuerpo a otras.

A pesar de las diferencias en su función y composición molecular específica de un tejido a otro, todas las formas de lámina basal contienen colágeno tipo IV, proteoglicanos, lamininas y otras glicoproteínas denominada *entactina o nidogen.* Las fibronectinas pueden o no estar presentes en la lámina basal, pero las lamininas son las glicoproteínas de adhesión más abundantes de ésta. Se piensa que las lamininas se localizan principalmente en la superficie de la lámina orientada hacia las células epiteliales que están por encima, ayudando a unir células a la lámina. Las fibronectinas, por otra parte, se localizan en la otra cara de la lámina, donde ayudan a anclar células del tejido conectivo.

Propiedades de la laminina. La laminina, proteína muy grande con un peso molecular alrededor de 850.000, está formada por tres cadenas polipeptídicas largas, denominadas α, β y γ. Hay varios tipos diferentes de cada una de las tres subunidades, las cuales pueden combinarse para formar muchos tipos distintos de laminina. Los puentes disulfuro mantienen unidas las cadenas polipeptídicas en forma de cruz, con parte del brazo largo enrollado formando una espiral de tres hebras (Figura 17.9). Al igual que la fibronectina, la laminina está formada por varios dominios, entre los que se incluyen sitios de unión para el colágeno tipo IV, la heparina, el heparán sulfato y la entactina, así como para proteínas receptoras de laminina situadas en la superficie de células adyacentes. Sus sitios de unión permiten a la lami-

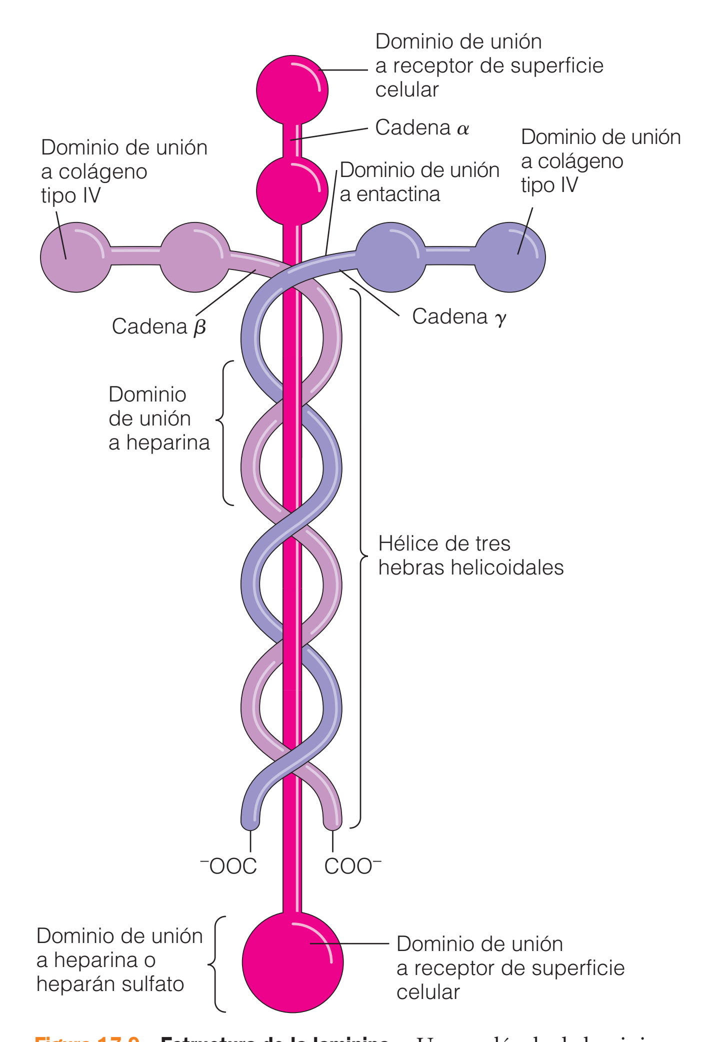


Figura 17.9 Estructura de la laminina. Una molécula de laminina se compone de 3 grandes cadenas polipeptídicas —α, β, y γ— unidas por puentes disulfuro en una estructura entrelazada. Una porción del brazo largo constituye una espiral de tres hebras. Los dominios funcionales de los extremos de las cadenas α unen receptores de superficie celular específicos de cada órgano, mientras que aquéllos de los extremos de los dos brazos de la cruz son específicos para el colágeno tipo IV. Los brazos de la cruz también contienen sitios de unión laminina-laminina, lo que permite que las moléculas de laminina se unan entre sí y formen grandes agregados. La laminina también contiene sitios de unión para heparina y heparán sulfato, así como para entactina (no mostrado).

nina servir como molécula puente que une células a la lámina basal. Las moléculas de entactina tienen sitios de unión tanto para laminina como para colágeno tipo IV y están por tanto pensadas para reforzar la unión del colágeno tipo IV y la red de laminina en la lámina basal.

Las integrinas son receptores de superficie celular que unen componentes de la ECM

Las fibronectinas y lamininas pueden unirse a las células animales porque las membranas plasmáticas de la mayoría de células tienen receptores específicos en sus superficies que reconocen y se unen a regiones específicas de la fibronectina o de la molécula de laminina. Estos receptores —y también aquéllos para otros componentes diversos de la ECM— pertenecen a una gran familia de proteínas transmembrana que se denominan **integrinas** a causa de su papel en la *integración* del citoesqueleto con la matriz extracelular. Las integrinas son receptores muy importantes, porque son el principal medio por el cual las células se unen a proteínas de la ECM tales como el colágeno, la fibronectina y la laminina.

Estructura de las integrinas. Una integrina se compone de dos grandes cadenas polipeptídicas transmembrana, las subunidades α y β, que se asocian entre ellas de modo no covalente (Figura 17.10). Las integrinas se diferencian entre sí por sus especificidades de unión y por los tamaños de sus subunidades (rango de pesos moleculares: 110.000-140.000 para la subunidad α; 85.000-91.000 para la subunidad β). Para una integrina específica, las porciones extracelulares de las subunidades α y β interactúan para formar el sitio de unión para una proteína particular de la ECM, dependiendo la mayor parte de la especificidad de unión de la subunidad α. En el lado citoplasmático de la membrana, las integrinas tienen sitios de unión para moléculas específicas del citoesqueleto, por tanto unen mecánicamente el citoesqueleto y la ECM a través de la membrana plasmática.

La presencia de múltiples tipos tanto de subunidades α como β da lugar a un gran número de diferentes heterodímeros de integrinas, que varían en sus especificidades de unión por las proteínas de la ECM y también en los tipos de células en las que se encuentran. Por ejemplo, las integrinas que contienen una subunidad β_1 se encuentran en la superficie de la mayoría de células de vertebrados y median principalmente las interacciones célula-ECM, mientras que aquellas que contienen una subunidad β_2 se restringen a la superficie de glóbulos blancos de la sangre y se relacionan principalmente con las interacciones célula-célula. Algunas cadenas α específicas confieren especificidad adicional a las integrinas. Por ejemplo, la integrina más común que une fibronectina es $\alpha_5\beta_1$, mientras que $\alpha_6\beta_1$ une laminina. Muchas integrinas reconocen la secuencia RGD en las glicoproteínas específicas de la ECM que unen. Sin embargo, los sitios de unión también deben reconocer otras partes de la molécula de glicoproteína, porque las integrinas muestran una especificidad de unión a glicoproteínas mayor de la que se puede esperar sólo por la secuencia RGD.

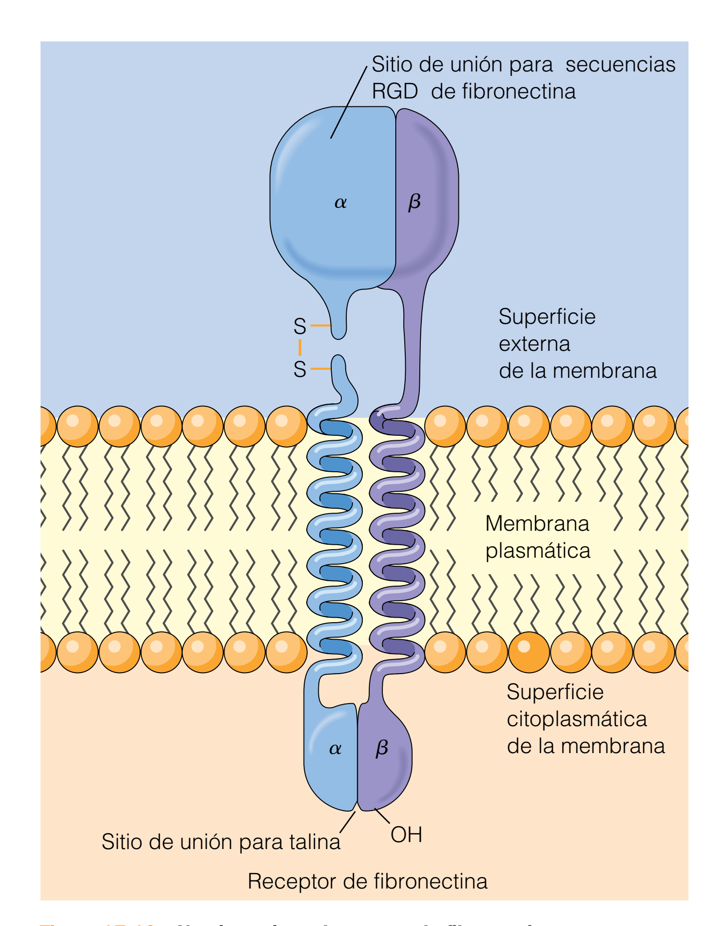


Figura 17.10 Una integrina: el receptor de fibronectina. Una integrina se compone de las subunidades α y β, cadenas polipeptídicas transmembrana que se asocian entre sí de modo no covalente para formar sitios de unión a ligando en la superficie externa de la membrana, y un sitio de unión para una proteína específica del citoesqueleto en la superficie interna de la membrana. Aquí se muestra el receptor de fibronectina ($\alpha_5\beta_1$), que tiene un sitio de unión para la fibronectina en la superficie externa y un sitio de unión para la talina situado en la cara citoplasmática de la membrana. En ésta y en otras muchas integrinas, la subunidad α está separada en dos segmentos que se mantienen juntos por medio de un puente disulfuro. Tanto las subunidades α como β están glicosiladas en su parte exterior, aunque las cadenas laterales de azúcar no se muestran aquí.

Las integrinas y el citoesqueleto. Aunque las integrinas unen la matriz extracelular y el citoesqueleto, no lo hacen de modo directo. De hecho, las colas de las integrinas interactúan con proteínas del citosol que conectan las integrinas con las proteínas del citoesqueleto. Hay dos tipos principales de conexiones que establecen las integrinas con el citoesqueleto (Figura 17.11). Las células migratorias y no-epiteliales, tales como los fibroblastos, se unen a moléculas de la matriz extracelular mediante **adhesiones focales**. Las ad-

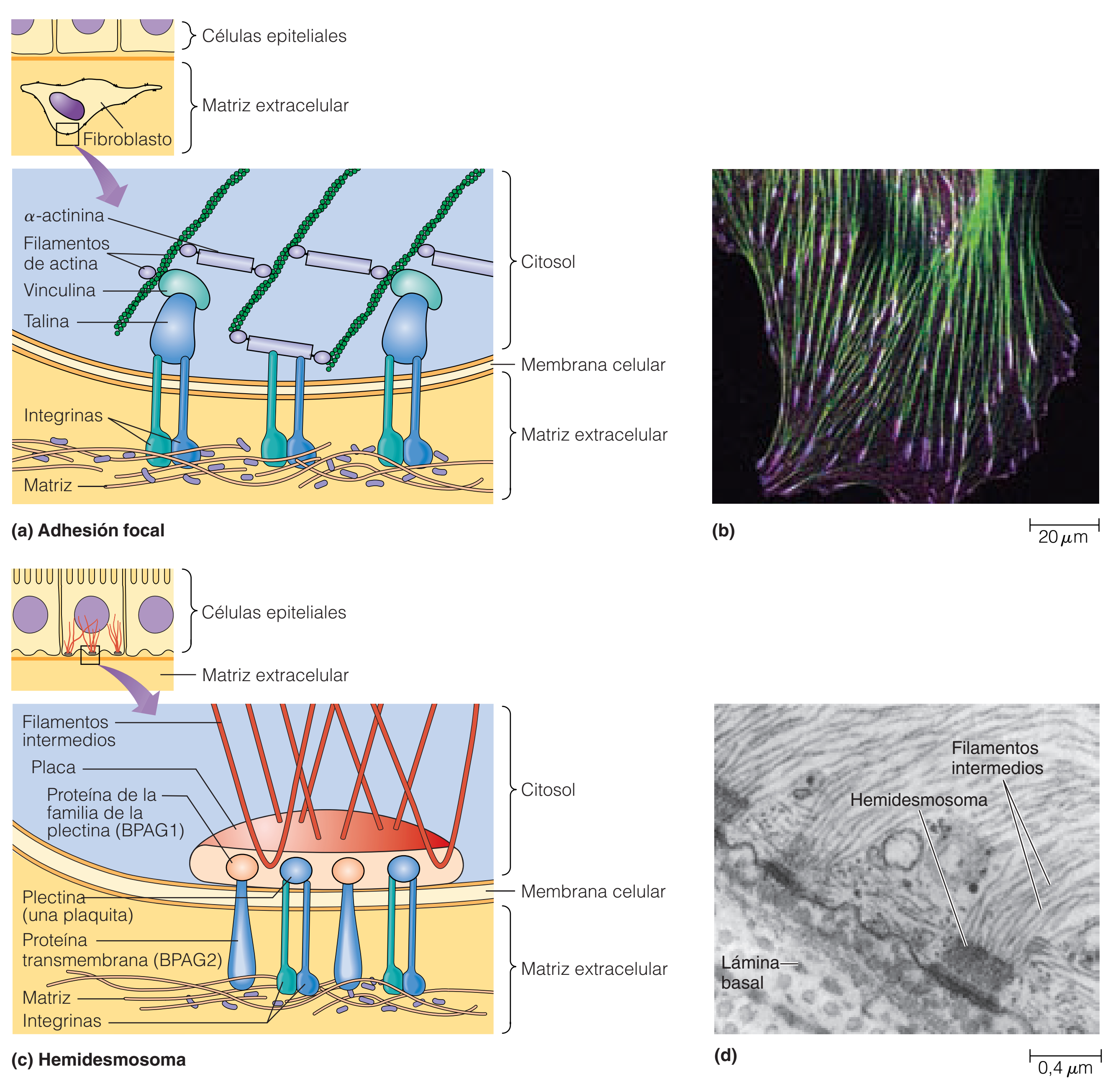


Figura 17.11 Integrinas, adhesiones focales y hemidesmosomas. (**a**) Células en migración se unen a la matriz extracelular por medio de adhesiones focales. Las adesiones focales contienen integrinas, como la integrina $\alpha_5\beta_1$, y proteínas intermediarias asociadas a integrina, tales como la talina, la vinculina y la α-actinina, que unen las integrinas al citoesqueleto de actina. (**b**) Una célula glial de rana en cultivo teñida para visualizar actina (verde) y con anticuerpos que reconocen la integrina β_1 (morado) y vinculina. Las rayas blancas representan regiones donde las tres proteínas se encuentran a la vez. Obsérvese cómo los microfilamentos de actina terminan en adhesiones focales (inmunofluorescencia). (**c**) Células epiteliales unidas a la matriz extracelular mediante hemidesmosomas, que contienen integrinas $\alpha_6\beta_4$, y conectadas a los filamentos intermedios por medio de proteínas intermediarias como la plectina. (**d**) La superficie externa de un hemidesmosoma limita directamente con la lámina basal (TEM).

hesiones focales contienen integrinas agrupadas que interactúan con haces de microfilamentos de actina por medio de varias proteínas intermediarias (Figura 17.11a y b). Entre éstas se incluyen la *talina*, que puede unirse a la proteína *vinculina* de unión a actina, y la *α-actinina*, que pueden unirse directamente a microfilamentos de actina. Muchas otras proteínas citosólicas se reclutan en las adhesiones focales; las interacciones entre ellas son complejas y son objeto de intensas investigaciones.

El otro tipo importante de adhesión mediada por integrinas se encuentra en las células epiteliales. Las células epiteliales se fijan a la laminina de la lámina basal mediante

hemidesmosomas (llamados así porque recuerdan a «medios desmosomas»; se hablará de los desmosomas más adelante en este capítulo). La integrina que se encuentra en los hemidesmosomas es la $\alpha_6\beta_4$; en este caso, las integrinas no se unen a la actina pero sí a los filamentos intermedios, generalmente de *queratina* (Figura 17.11c y d). Las proteínas intermediarias en los hemidesmosomas forman una **placa densa** que conecta integrinas agrupadas con el citoesqueleto. Entre las proteínas intermediarias, son muy abundantes los miembros de la familia de proteínas *plaquinas.* Una plaquita, conocida como *plectina,* fija los filamentos de queratina a las integrinas. Además, otra proteína transmembrana llamada BPAG2 y su plaquina asociada, BPAG1, puede servir como puente entre la queratina y la laminina. Estas proteínas se identificaron por primera vez usando anticuerpos derivados de pacientes que desarrollaban una reacción autoinmune contra antígenos de sus propios hemidesmosomas. La enfermedad resultante, denominada *pénfigo ampolloso*, afecta sobre todo a gente mayor, y conlleva la formación de ampollas en la piel. Esta enfermedad también da lugar a los nombres de estas proteínas. (BPAG viene de *b*ullous *p*emphigoid *a*ntigen.)

Función de las integrinas. Al unir componentes de la ECM que están en el exterior celular y microfilamentos de actina que están en el interior, las integrinas pueden desempeñar papeles importantes en la regulación del movimiento y los anclajes celulares, tanto en tejidos adultos como embrionarios. Por ejemplo, los ratones que carecen de una subunidad particular de integrina (α_7) necesaria para anclarse a la laminina desarrollan una forma característica de ditrofia muscular degenerativa. Los humanos que portan la mima mutación desarrollan degeneración muscular progresiva. Recordad que los hemidesmosomas usan las integrinas $\alpha_6\beta_4$ para fijarse a la laminina. Los humanos que portan mutaciones en la subunidad α_4 desarrollan *epidermolisis ampollar de unión*, una enfermedad severa con ampollas en la piel.

Integrinas y señalización. Aunque un papel clave de las integrinas es su capacidad para unir el citoesqueleto y la matriz extracelular, ahora está claro que también interactúan con vías de señalización intracelulares. Por ejemplo, señales tales como la unión de factores de crecimiento que provocan la activación de MAP quinasas (*véase* Capítulo 14) pueden inducir la agrupación de integrinas. (Tales efectos son frecuentemente denominados señalización «de dentro a fuera», porque cambios internos en la célula ocasionan efectos sobre los integrinas de la superficie.) Las integrinas pueden actuar también como receptores que activan la señalización intracelular por sí mismos (algunas veces denominada señalización «de fuera a dentro»). Las primeras observaciones que sugerían la relación de las integrinas en vías de señalización provienen de estudios con células tumorales. Para que la mayoría de células normales crezcan en cultivo, deben fijarse a un sustrato. Incluso en presencia de factores de crecimiento que normalmente estimulan su proliferación, si se evita que las células se unan a una capa de matriz extracelular, éstas dejarán de dividirse y entrarán en apoptosis (*véase* Capítulo 14). Este comportamiento es conocido como **crecimiento dependiente de anclaje**. Por el contrario, las células tumorales continuarán creciendo incluso cuando no estén firmemente ancladas a una capa de matriz extracelular.

El crecimiento dependiente de anclaje implica la activación de vías intracelulares que produzcan la agrupación de integrinas. Posteriormente a la agrupación de integrinas, se activan varias quinasas en las adhesiones focales. Son reclutadas hasta las adhesiones focales por proteínas adaptadoras tales como *paxillina.* Entre estas quinasas se incluyen las *quinasas de adhesión focal* (FAK) y las quinasas unidas a integrina (ILK). FAK parece ser importante en la regulación del crecimiento dependiente de anclaje. Las células tumorales contienen FAK activada incluso cuando no están ancladas, y las células normales pueden ser transformadas en células parecidas a tumorales por la expresión de una forma mutante y activada de FAK. Estos experimentos subrayan la importancia de la adhesión celular para entender el cáncer.

El glicocálix es una zona rica en carbohidratos situada en la periferia de las células animales

El límite entre la matriz extracelular y la superficie celular es rico en carbohidratos. En plantas, algas, hongos y bacterias, esta zona rica en carbohidratos se organiza formando una pared celular rígida que proporciona protección y soporte estructural a la célula. Aunque las células animales no tienen una envuelta rígida como la pared celular, una zona rica en carbohidratos denominada **glicocálix** suele estar presente inmediatamente por fuera de la membrana plasmática (*véase* Figura 7.27). Entre las funciones del glicocálix se incluyen el reconocimiento y la adhesión celular, la protección de la superficie celular y la creación de barreras permeables.

El glicocálix tiene dos componentes, denominados *glicocálix anclado* y *glicocálix sin anclar*. El glicocálix anclado está compuesto principalmente por cadenas de carbohidrato unidas a glicoproteínas y glicolípidos que son componentes integrales de la membrana plasmática. Por el contrario, el glicocálix sin anclar puede ser fácilmente eliminado. Estructuras especializadas, tales como la capa más externa de las amebas y la capa gelatinosa que rodea a la mayoría de los ovocitos animales, son ejemplos de glicocálix sin anclar.

Reconocimiento célula-célula y adhesión

Hasta aquí, hemos tratado con algo de detalle las interacciones entre células animales y la matriz extracelular en la cual están inmersas la mayoría de células, señalando los modos en que la ECM influye sobre las células, y viceversa.

Ahora pasaremos a hablar de las interacciones entre células. La integridad de los organismos multicelulares depende de la capacidad de las células individuales para asociarse según patrones precisos y formar tejidos, órganos y sistemas. Estas interacciones tan ordenadas requieren, a su vez, que las células individuales sean capaces de reconocerse, adherirse y comunicarse entre ellas. En esta sección discutiremos el contacto célula-célula y consideraremos las uniones intercelulares más adelante en este capítulo.

La adhesión célula-célula está mediada por proteínas transmembrana

Así como las integrinas sirven como receptores transmembrana que unen células a la matriz extracelular, las moléculas de adhesión sirven para unir células entre sí. Ahora sabemos que tales receptores de adhesión pertenecen a un número relativamente pequeño de clases. En estas clases se incluyen proteínas de la *superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF), cadherinas, selectinas* y, en algunos casos, *integrinas* (Figura 17.12). En cada caso, la proteína de adhesión de la superficie de una célula une el ligando apropiado de la superficie de una célula vecina. En algunos casos, en los que intervienen muchas cadherinas y miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas conocidos como CAMs, las células interactúan con moléculas idénticas de la superficie de las células a las que se adhieren. Tales interacciones se denominan **interacciones homofílicas** (del griego *homo*, «igual», y *philia*, «afinidad»). En otros casos, en los que intervienen selectinas, un receptor de adhesión celular de una de las células interacciona con una molécula diferente de la superficie de la célula a la que se une. Tales interacciones se denominan **interacciones heterofílicas** (del griego, *hetero*, «diferente»). Al igual que sucede con las integrinas, muchos receptores de adhesión transmembrana se unen al citoesqueleto por medio de proteínas intermediarias, que se diferencian en función de la clase de molécula y su localización dentro de la célula. En las siguientes secciones, consideraremos ejemplos de cada una de estas clases importantes de moléculas de adhesión célula-célula.

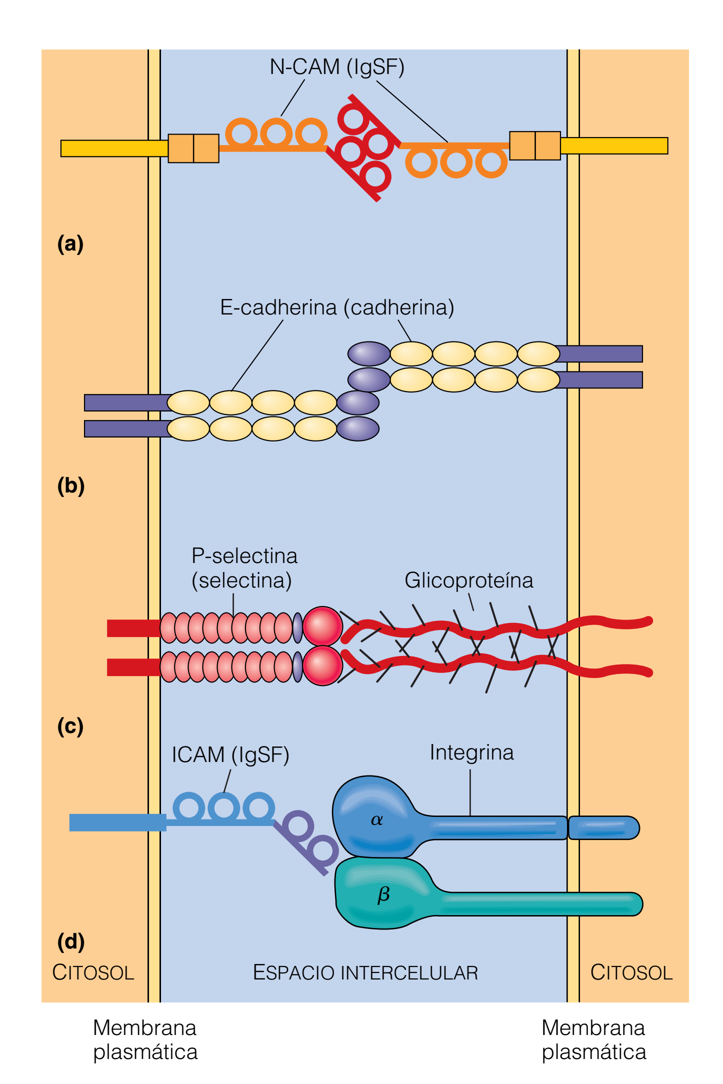


Figura 17.12 Diferentes tipos de proteínas de adhesión célula-célula. Las células se adhieren a otras células usando proteínas transmembrana que se agrupan en pocas clases principales. Éstas incluyen (**a**) proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF), tales como N-CAM, (**b**) cadherinas, tales como E-cadherina, (**c**) selectinas, que se unen a carbohidratos de glicoproteínas de otras células, e integrinas (**d**) que en pocos casos como en leucocitos, se unen a proteínas IgSF tales como ICAM de la superficie de las células endoteliales.

CAMs. Un modo de identificar moléculas implicadas en la adhesión célula-célula es desarrollando anticuerpos contra tipos específicos de moléculas de las membranas o moléculas de superficie. Si un anticuerpo perturba específicamente la adhesión célula-célula, la proteína a la cual se une este anticuerpo estará probablemente relacionada en el proceso de adhesión. Este enfoque fue usado por primera vez con éxito a finales de los años 70 por Gerald Edelman y sus colaboradores para identificar una glicoproteína de membrana del tejido nervioso que denominaron *molécula de adhesión celular neural (N-CAM)*. Cuando las células embrionarias eran expuestas a anticuerpos dirigidos contra N-CAM, las dejaban de unirse entre sí y se alteraba la ordenada formación del tejido neuronal.

Las CAMs son miembros de la **superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF).** Las proteínas de esta gran familia se llaman así porque contienen dominios caracterizados por dominios bien organizados en forma de lazo, que son parecidos a los que están presentes en las subunidades de las inmunoglobulinas que constituyen los anticuerpos. CAMs, tales como N-CAM, en una célula interaccionan de modo homofílico con CAMs de una célula adyacente por medio de estos dominios. Otros miembros de las IgSF interaccionan heterofílicamente con sus ligandos. Los miembros de las IgSF participan en un amplio rango de procesos de adhesión. En el sistema nervioso embrionario, moléculas de esta superfamilia, tales como N-CAM y L1-CAM, están re-

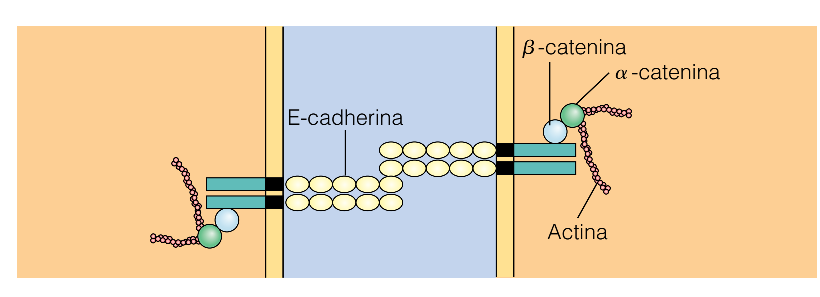
lacionadas en el crecimiento agrupamiento neuronal. Personas con mutaciones en el gen L1-CAM muestran defectos en el cuerpo calloso (una región que interconecta los dos hemisferios del cerebro), retraso mental y otros defectos.

Cadherinas. El uso de anticuerpos para bloquear la adhesión celular también permitió el descubrimiento de las **cadherinas**, un grupo muy importante de glicoproteínas de adhesión que se encuentran en la membrana plasmática de la mayoría de las células animales. Al igual que las CAMs, las cadherinas desempeñan un papel crucial en el reconocimiento y adhesión célula-célula. Estos dos grupos de proteínas pueden ser distinguidos entre sí porque las cadherinas, pero no las CAMs, requieren calcio para funcionar. El Ca^{2+} induce un cambio conformacional en las cadherinas que les permite mediar la adhesión célula-célula.

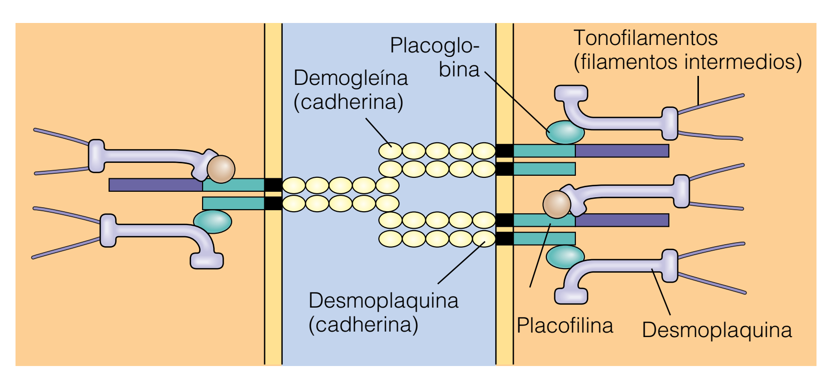
Las cadherinas se caracterizan por una serie de subunidades que son similares estructuralmente (o «repeticiones») en sus dominios extracelulares. Los miembros de la superfamilia de las cadherinas presentan una amplia variación en el número de estas repeticiones, y varían en la estructura de sus terminaciones citosólicas. La cadherina mejor caracterizada, la E-cadherina, tiene cinco de estos dominios repetidos. Las moléculas de E-cadherina se asocian por parejas en la membrana plasmática; sus dominios extracelulares tienen una estructura que les permite «unirse como una cremallera» de modo homofílico, cuando las cadherinas de una célula se entrelazan con las de una célula adyacente (Figura 17.13). En sus terminaciones citosólicas, las cadherinas conectan con el ciotesqueleto. Al igual que las integrinas, estos anclajes unen la superficie celular con el citoesqueleto. Examinaremos más en profundidad estas conexiones cuando hablemos sobre la estructura de las uniones célula-célula.

Diferentes cadherinas se expresan en tejidos específicos; la regulación de su expresión es una característica especialmente asombrosa del desarrollo embrionario. El papel desempeñado por distintas cadherinas en la adhesión célula-célula ha sido investigado en fibroblastos cultivados denominados *células L*, las cuales se unen pobremente entre sí y contienen poca cadherina. Cuando se introduce DNA purificado que codifica para la E-cadherina o la P-cadherina en las células L, éstas empiezan a producir cadherinas y a unirse más firmemente entre sí. Además, las células L que producen E-cadherina se unen preferentemente a otras células que producen E-cadherina. De igual modo, las células que producen P-cadherina se unen selectivamente a otras células que también están produciendo P-cadherina (Figura 17.14). Estas observaciones sugieren que, al igual que sucede con las CAMs, la cantidad y tipos de moléculas de cadherina ayuda a segregar a las células en tejidos específicos.

Las cadherinas desempeñan papeles especialmente importantes durante el desarrollo embrionario. Durante el desarrollo temprano de los vertebrados, las células resultantes de las primeras divisiones celulares deben unirse entre sí mientras se organizan en tejidos. Cuando se trata a los embriones tempranos de mamíferos con anticuerpos que interfieren con E-cadherina, o cuando se crean embriones mutantes que no pueden producir E-cadherina, se observa



(a) Uniones adherentes



(b) Desmosoma

Figura 17.13 Estructura de las cadherinas. Las cadherinas se encuentran en sitios de adhesión célula-célula. (**a**) Las cadherinas «clásicas», como la E-cadherina, median la adhesión célula-célula en las uniones adherentes. Las moléculas de E-cadherina se asocian por parejas (homodímeros) en la membrana plasmática e interactúan con homodímeros de células cercanas a través de sus dominios extracelulares. Su cola citosólica se une a la proteína de unión, β-catenina. La β-catenina a su vez se une a α-catenina, que se fija a los microfilamentos de actina. (**b**) Las cadherinas de los desmosomas, denominadas desmocolinas y desmogleínas, probablemente interactúan por parejas; las células cercanas probablemente se unen entre sí por sus desmogleínas. En el citosol, las cadherinas desmosomales interactúan con proteínas de la placa desmosomal (placoglobina, placofilina y desmoplaquina) que anclan los desmosomas a los filamentos intermedios.

Células L

Células modificadas genéticamente que producen P-cadherina

Células modificadas genéticamente que producen E-cadherina

(a) (b) (c) 100 μm

(d) Tinción para P-cadherina 200 μm

(e) Tinción para E-cadherina 200 μm

Figura 17.14 Efecto de las cadherinas en las adhesiones celulares. (**a**) Micrografía de células L en cultivo que muestra cómo estas células normalmente no se adhieren entre sí. (**b** y **c**) Cuando el DNA que codifica para la E-cadherina o P-cadherina se introduce en estas células, la cadherina se sintetiza y se produce la adhesión célula-célula. (**d** y **e**) Micrografías de fluorescencia de agregados de células que se forman cuando las células que producen P-cadherina se mezclan con células que producen E-cadherina. El mismo campo se tiñe con anticuerpos fluorescentes específicos para P-cadherina (rojo) o E-cadherina (verde). El patrón de tinción muestra que las células que producen P-cadherina se localizan en áreas diferentes a las células que producen E-cadherina, y las células que sintetizan P-cadherina se unen preferentemente a otras células que producen P-cadherina.

que sus células pierden su estrecha adhesión y los embriones no se desarrollan. Los embriones de rana tienen un requisito similar para la cadherina; cuando se elimina el ARNm del principal tipo de cadherina que se encuentra en embriones tempranos, pierden su organización normal (Figura 17.15). También ocurren cambios en la expresión de cadherina en las células tumorales. Cuando tumores bien definidos empiezan a metastatizar y extenderse por el cuerpo, las células metastásicas pierden cadherina de sus superficies; la pérdida de adhesión se piensa que contribuye a la capacidad de estas células para desanclarse y migrar a través del cuerpo.

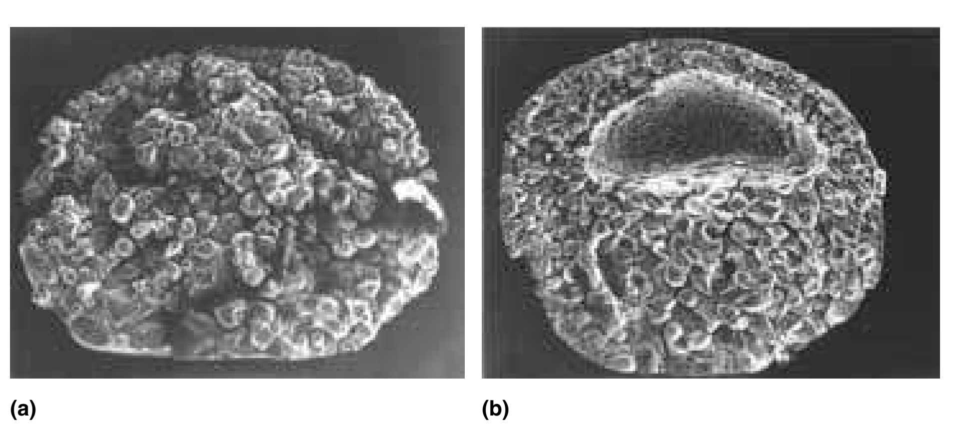


Figura 17.15 Cadherinas durante el desarrollo embrionario. Tras muchos ciclos de división celular, los embriones de rana forman una blástula, que contiene un espacio delimitado por células que está lleno de fluido. Cuando se elimina el RNAm de una cadherina conocida como EP-cadherina, dejan de producir la proteína EP-cadherina y pierden su organización normal (**a**) en comparación con embriones normales (**b**).

Los grupos de carbohidratos son importantes en el reconocimiento y adhesión célula-célula

Las cadenas laterales de carbohidratos de CAMs y cadherinas afectan tanto a la resistencia como a la especificidad de las interacciones célula-célula. Las moléculas N-CAM, por ejemplo, contienen largas cadenas repetidas de *ácido siálico*, un carbohidrato cargado negativamente (*véase* Figura 7.26a). La cantidad de ácido siálico unido a N-CAM cambia significativamente durante el desarrollo, sugiriendo un posible papel en la regulación de la adhesión celular.

Lectinas. También se sugiere que los carbohidratos tienen un papel en la adhesión celular por el hecho de que muchas células animales y vegetales secretan proteínas de unión a carbohidratos denominadas **lectinas**, las cuales promueven la adhesión celular por unión a un azúcar específico o secuencia de azúcares expuestos en la superficie externa de la célula. Como una molécula de lectina generalmente tiene más de un sitio de unión a carbohidrato, puede unirse a grupos de carbohidratos de dos células diferentes, y por tanto conectar dichas células entre sí.

Los carbohidratos y la supervivencia de eritrocitos. Un ejemplo de la importancia de los carbohidratos en la superficie celular especialmente bien conocido es la determinación de los grupos sanguíneos humanos A, B, AB y O por una cadena lateral específica de carbohidrato presente en un glicolípido de la membrana plasmática de los eritrocitos.

El grupo sanguíneo ABO, como es denominado, implica diferencias en las cadenas laterales de carbohidratos de la superficie de los glóbulos rojos que pueden ser detectadas por anticuerpos presentes en la sangre, que provocan la aglutinación de los glóbulos rojos y probablemente la muerte del paciente si se usa un tipo sanguíneo incorrecto en una transfusión.

Las distinciones entre los cuatro tipos sanguíneos en el sistema ABO dependen de modestas diferencias determinadas genéticamente en la estructura de una cadena ramificada de carbohidratos anclada a un glicolípido específico en la membrana plasmática de los eritrocitos. Los individuos con grupo sanguíneo A tienen el amino azúcar N-acetilgalactosamina (GalNAc) en la terminación de estos carbohidratos, mientras que los individuos con grupo sanguíneo B tienen galactosa en su lugar. Los individuos con grupo sanguíneo AB tienen presente tanto N-acetilgalactosamina como galactosa, y en individuos del tipo O, estos azúcares terminales están perdidos por completo.

Estas mínimas diferencias tienen importantes efectos en la compatibilidad de las transfusiones sanguíneas, porque las personas con grupos sanguíneos A, B y O tienen anticuerpos en su torrente sanguíneo que reconocen y se unen a los respectivos azúcares terminales de estos glicolípidos específicos. Un individuo cuya sangre contiene anticuerpos contra uno o ambos azúcares (GalNAc o Gal) no puede aceptar sangre que contenga el glicolípido con ese azúcar terminal porque los anticuerpos presentes en la sangre se unirían a los grupos de carbohidratos situados sobre la superficie de los eritrocitos y provocarían la coagulación o aglutinación de los eritrocitos. Los individuos con el grupo sanguíneo A tienen anticuerpos contra cadenas de carbohidratos que terminan en galactosa, la cual se encuentra en los grupos sanguíneos B y AB. Los individuos del grupo A por tanto no pueden ser transfundidos con sangre del tipo B o AB, pero pueden aceptar sangre de donantes A o O. Por el contrario, los individuos con sangre del tipo B tienen anticuerpos contra cadenas de carbohidratos que terminan en GalNAc, la cual está presente en sangres de los tipos A y AB. Los individuos del grupo B por tanto no pueden ser transfundidos con sangre del tipo A o AB, pero pueden aceptar sangre del tipo B o O. Los individuos con el grupo sanguíneo O se denominan donantes universales, porque sus eritrocitos no generan una respuesta inmune cuando son transfundidos en individuos de cualquier grupo sanguíneo.

Selectinas y adhesión de leucocitos. El reconocimiento de carbohidratos también desempeña un papel importante durante las interacciones de los leucocitos con las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos o con las plaquetas. Las glicoproteínas de superficie celular denominadas **selectinas** median estas interacciones; en cada tipo celular se expresa una selectina diferente (L-selectina en leucocitos, E-selectinas en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, y P-selectinas en plaquetas y células endoteliales). Los leucocitos ruedan a lo largo de las paredes de los vasos sanguíneos. Durante la inflamación, se unen a la pared de un vaso sanguíneo en las inmediaciones de la inflamación y luego migran a través de los vasos sanguíneos al sitio de la inflamación. La adhesión inicial de los leucocitos está mediada por la unión de selectinas de los leucocitos a los carbohidratos de la superficie de las células endoteliales y por selectinas de las células endoteliales que se unen a carbohidratos de la superficie de los leucociotos. Esto es seguido por adhesiones más estables mediadas por una integrina específica de la superficie de los leucocitos y proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas denominadas ICAMs de la superficie de las células endoteliales (Figura 17.16).

Uniones celulares

Por definición, los organismos unicelulares no tienen asociaciones permanentes entre células; cada célula es una entidad en sí misma. Los organismos multicelulares, por otro lado, tienen medios específicos para unir células en asociaciones permanentes para formar tejidos y órganos. Dichas asociaciones generalmente suponen modificaciones especializadas de la membrana plasmática en el punto donde las dos células se unen. Estas estructuras especializadas se denominan **uniones celulares**. En animales, las tres clases más comunes de uniones celulares son las *uniones adherentes, las*

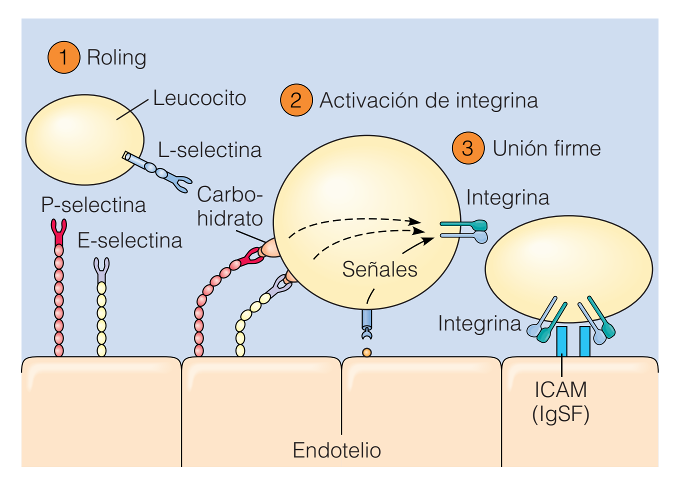


Figura 17.16 Adhesión leucocitaria y selectinas. La unión inicial de los leucocitos a las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos está mediada por selectinas. Los leucocitos unidos ruedan a lo largo de la pared de los vasos sanguíneos, donde entran en contacto con factores de activación que están depositados en la superficie de las células endoteliales. Esto conduce a la activación de las integrinas de los leucocitos, las cuales se unen a las proteínas IgSF (como ICAMs), permitiendo a los leucocitos adherirse firmemente a las células endoteliales. Tal adhesión permite detenerse a los leucocitos y pasar a través de los vasos sanguíneos hasta los sitios de inflamación.

uniones estrechas y las uniones comunicantes o de tipo nexo. La Figura 17.17 ilustra cada una de estas clases de uniones.

En las plantas, la presencia de una pared celular entre la membrana plasmática de células adyacentes impide la existencia de las uniones celulares que unen a las células animales. Sin embargo, la pared celular y las estructuras especiales denominadas *plasmodesmos* desempeñan funciones similares, como veremos a continuación en este capítulo.

Las uniones adherentes unen células adyacentes entre sí

Una de las tres principales clases de uniones de las células animales es la unión adherente (o de anclaje) (Tabla 17.3). Las uniones adherentes conectan a las células entre sí formando tejidos, y por tanto les permiten funcionar como una unidad. Al igual que las adhesiones focales y los hemidesmosomas, todas las uniones de esta categoría anclan el citoesqueleto a la superficie celular. La red resultante de citoesqueletos interconectados ayuda a mantener la integridad del tejido y a soportar el estrés mecánico.

Las dos clases principales de uniones adherentes célula-célula son las *uniones adherentes* y los *desmosomas* (Figura 17.17). A pesar de las diferencias estructurales y funcionales, todas las uniones adherentes contienen dos clases distintas de proteínas: las *proteínas de anclaje intracelular*, que conectan el tipo de unión con los filamentos del citoesqueleto apropiados en el interior de la membrana plasmática, y las *cadherinas*, que sobresalen en la superficie externa de la membrana y unen células entre sí. En el caso de los des-

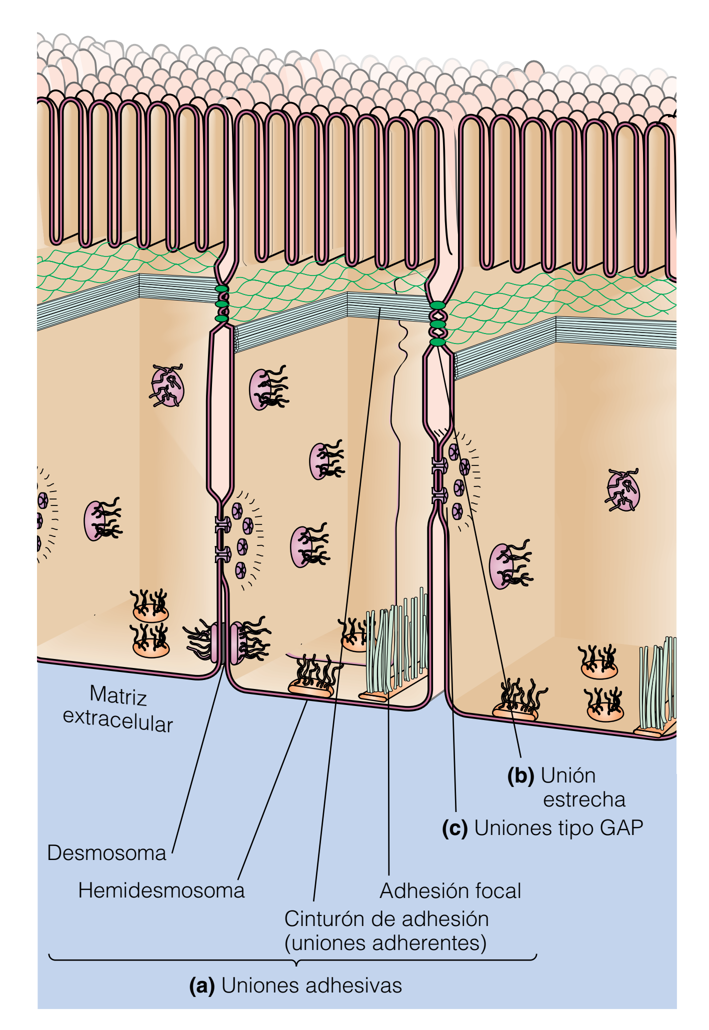


Figura 17.17 Tipos principales de uniones celulares en las células animales. (**a**) Las uniones adherentes se encargan de las uniones célula-célula y célula-ECM. Los desmosomas y los hemidesmosomas se unen a los filamentos intermedios dentro de la célula, mientras que las uniones adherentes y las adhesiones focales se unen a microfilamentos de actina. (**b**) Las uniones estrechas crean un cinturón impermeable entre células, impidiendo, por tanto, que los fluidos, moléculas e iones crucen una capa celular a través del espacio intercelular. (**c**) Las uniones tipo GAP proporcionan comunicación química y eléctrica directa entre células porque permiten el paso de moléculas pequeñas e iones de una célula a otra.

mosomas, las proteínas de anclaje intracelular forman una *placa* fibrosa en el lado citoplasmático de la membrana plasmática.

Uniones adherentes. Las uniones adherentes mediadas por cadherinas que se conectan con el citoesqueleto por microfilamentos de actina reciben el nombre de **uniones adherentes** (*véase* Tabla 17.3). En las uniones adherentes, el espacio entre membranas adyacentes es de aproximadamente 20-25 nm. Las uniones adherentes son especialmente numerosas en el músculo cardíaco y en las finas capas de tejido que revisten las cavidades del cuerpo y recubren los ór-

Tabla 17.3 Uniones entre células animales

Tipos de unión	Función	Características del espacio intermembrana	Espacio	Estructuras asociadas
Uniones adhesivas				
Adhesiones focales	Adhesión célula-ECM	Puntos de unión localizados	20-25 nm	Microfilamentos de actina
Hemidesmosoma	Adhesión célula-lámina basal	Puntos de unión localizados	25-35 nm	Filamentos intermedios (tonofilamentos)
Uniones adherentes	Adhesión célula-célula	Zonas de unión continuas	20-25 nm	Microfilamentos de actina
Desmosome	Adhesión célula-célula	Puntos de unión localizados	25–35 nm	Filamentos intermedios (tonofilamentos)
Uniones estrechas	Sellado de espacios entre células	Membranas unidas a lo largo de crestas	ninguno	Proteínas de unión transmembrana
Uniones tipo nexo	Intercambio de iones y moléculas entre células	Conexones (proteínas transmembrana con poros de 3 nm)	2-3 nm	Conexones de una membrana alineados con los de otra para formar canales entre células

ganos. En estas *células epiteliales*, las uniones adherentes forman generalmente un *cinturón de adhesión* continuo, una extensa zona que rodea completamente a las células en una lámina de tejido (*véase* Figura 17.17a). En células no epiteliales, tales como las neuronas, las uniones tipo adherentes forman puntos más pequeños de anclaje. Por ejemplo, las sinapsis neuronales, regiones donde las neuronas están en contacto estrecho, contienen muchas de las mismas proteínas que se encuentran en las uniones adherentes de las células epiteliales.

Como vimos en el caso de los contactos focales, las uniones adherentes son puntos de anclaje entre la superficie celular y el citoesqueleto. De la misma manera que las integrinas en los contactos focales están conectadas al citoesqueleto de actina por proteínas intermediarias, esto también sucede con las cadherinas en las uniones adherentes (Figura 17.13a). En este caso, una proteína conocida como *β-catenina* (o en algunos casos, una proteína relacionada conocida como *placoglobina*) se une a la cola citosólica de la cadherina; la *β-catenina* a su vez se une a una segunda proteína denominada *α-catenina*, que puede unirse a la actina para completar la unión. En algunos casos estas uniones son muy fuertes. En las células del músculo cardíaco, por ejemplo, los microfilamentos de actina de las uniones adherentes se continúan con los microfilamentos responsables de la contracción muscular.

Hemos visto que la adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular son importantes para el funcionamiento normal de las células y tejidos en el cuerpo. Un descubrimiento sorprendente de la microbiología moderna es que muchos patógenos, tales como los responsables de varios tipos de intoxicaciones alimenticias, infectan al cuerpo usando estos mismos sistemas de adhesión para poder penetrar en células sanas. Estos mecanismos de infección se discutirán con más detalle en el Anexo 17a.

Desmosomas. Los desmosomas son puntos de fuerte adhesión, con forma de botón, entre células adyacentes en un tejido corporal. Tales adhesiones célula-célula dan integridad estructural al tejido, permitiendo a las células funcionar como una unidad y resistir el estrés mecánico. Los desmosomas se encuentran en muchos tejidos pero son especialmente abundantes en la piel, el músculo cardíaco y el cuello del útero.

La estructura de un desmosoma típico se muestra en la Figura 17.18. Las membranas plasmáticas de las dos células adyacentes están alineadas en paralelo, separadas por un espacio de alrededor de 25-35 nm. El espacio extracelular entre las dos membranas se denomina *núcleo del desmosoma*. Una placa gruesa se encuentra justo debajo de la membrana plasmática de cada una de las dos células adyacentes El núcleo del desmosoma está lleno de filamentos y gránulos de proteínas denominadas *desmocolinas* y *desmogleínas*. Éstas son las cadherinas que interactúan con la placa en la cara interna de la membrana plasmática y median la adhesión célula-célula en la superficie externa de la membrana.

A diferencia de la E-cadherina, las democolinas y desmogleínas probablemente interaccionan heterofílicamente en el espacio intercelular. Al igual que en otras cadherinas, las proteínas intermediarias se unen a su cola citosólica y las conectan con el citoesqueleto. La proteína placoglobina, de la familia β-catenina, se une a la desmocolina; la placoglobina a su vez se une a una proteína plaquina denominada desmoplaquina (Figura 17.13b). La desmoplaquina se une a su vez a los **tonofilamentos,** los cuales, como vimos en el caso de los hemidesmosomas, están compuestos de filamentos intermedios como los de *vimentina*, *desmina* o *queratina*. Los desmosomas forman una red continua de citoesqueleto a través del tejido mediante la unión de los filamentos intermedios de células adyacentes.

Intoxicaciones alimentarias y «bichos malos»: la conexión de la superficie celular

La adhesión y el reconocimiento celular desempeñan papeles importantes durante la formación de los tejidos normales del cuerpo, y en el funcionamiento normal de las células del cuerpo humano adulto, como por ejemplo, las células sanguíneas. De modo sorprendente, los invasores extraños que atacan el cuerpo humano pueden usar las mismas proteínas que requieren las células sanas para la adhesión celular para poder infectar el cuerpo. Consideramos aquí un ejemplo de cómo una bacteria se une a las células humanas y las infecta: las bacterias enteropatogénicas.

Las bacterias enteropatogénicas usan proteínas normales de adhesión celular para infectar a las células huésped

Un buen ejemplo de esta clase de «secuestro molecular» de los procesos normales de adhesión celular tiene lugar cuando una bacteria entra en el tracto digestivo (como por ejemplo las bacterias denominadas enteropatogénicas; *entero-* viene del término griego «para intestino»). Estas bacterias son responsables de varios tipos de intoxicaciones alimenticias, y sus efectos combinados tienen un impacto importante en la salud pública. Aunque algunas bacterias patogénicas pueden usar múltiples métodos para poder entrar en el intestino, en varios casos bien estudiados, lo que hacen es unirse a moléculas de adhesión celular como son las integrinas o las cadherinas.

Uno de los ejemplos mejor estudiados de esta subversión de la adhesión celular es el del enteropatógeno *Yersinia pseudotuberculosis.* La infección por bacterias del género *Yersinia* generalmente produce una gastroenteritis con diarrea y vómitos tras 24-48 horas desde la exposición, la cual generalmente ocurre por agua y comida contaminada. *Y. pseudotuberculosis* usa una proteína de 986 aminoácidos presente en su membrana externa, denominada *invasina*, para penetrar en las células de los mamíferos. De modo sorprendente, los receptores celulares para la invasina son integrinas que contienen subunidades β_1 y que se localizan en la superficie de las células que revisten el intestino (Figura 17A.1). La identificación del receptor celular para *Yersinia* fue un descubrimiento importante, porque demostró que las bacterias podían invadir las células actuando sobre proteínas normales de la superficie celular de las células de mamíferos.

Al haberse identificado las vías moleculares que usan otras bacterias para poder invadir a las células huésped, la participación de las proteínas normales de la superficie celular en patogénesis se ha convertido en un tema corriente. Una segunda bacteria enteropatogénica, *Shigella flexnerii* también se une a una integrina ($\alpha_5\beta_1$) por medio de las proteínas de su superficie. Las infecciones por *Shiglla* provocan disentería y generalmente se producen por comida cruda contaminada por su manipulación. En Estados Unidos se producen anualmente alrededor de 300.000 casos de shigellosis, convirtiéndolo en un problema de salud significativo.

Otro ejemplo bien estudiado de la subversión de la adhesión celular es el de *Listeria monocytogenes.* La infección por *Listeria* puede producirse por la exposición a alimentos crudos preparados incorrectamente, como por ejemplo la leche y las hamburguesas crudas. Aunque la incidencia de la listeriosis en los Estados Unidos no es alta (alrededor de unas 200 personas desarrollan síntomas anualmente), una vez que se produce la infección, ésta es muy seria. Aproximadamente el 25% de los infectados muere; muchos de ellos contraen meningitis bacteriana. *Listeria* expresa una proteína denominada *internalina A* en su superficie que puede unirse a la E-cadherina de la superficie de las células del intestino (Figura 17A.1). La unión de las bacterias patogénicas a las células del intestino provoca enormes cambios en el citoesqueleto de las células infectadas. Ahora sabemos que del mismo modo que estas bacterias «secuestran» la maquinaria normal de adhesión celular de las células del intestino, también pueden hacer lo propio con el citoesqueleto una vez que están dentro de las células infectadas (*véase* Anexo 15a).

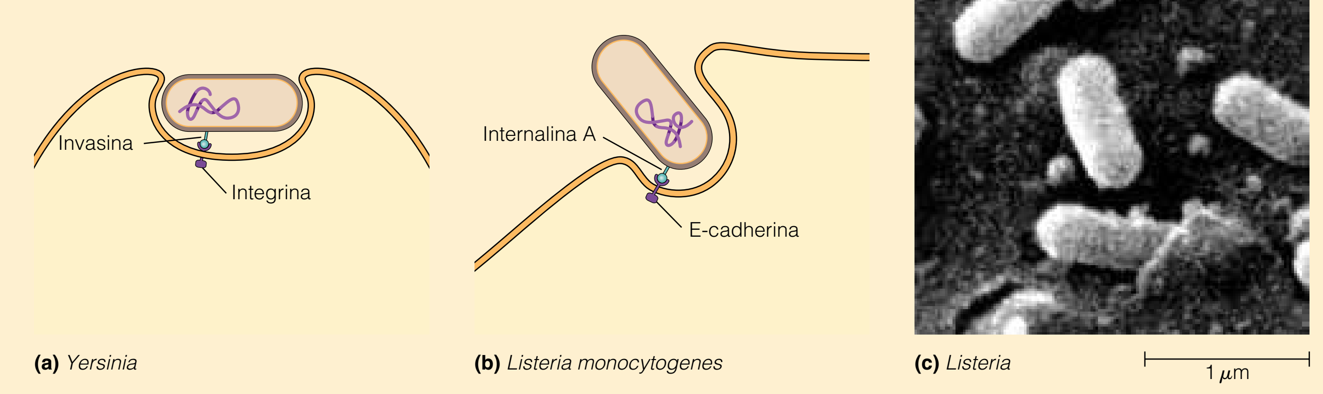
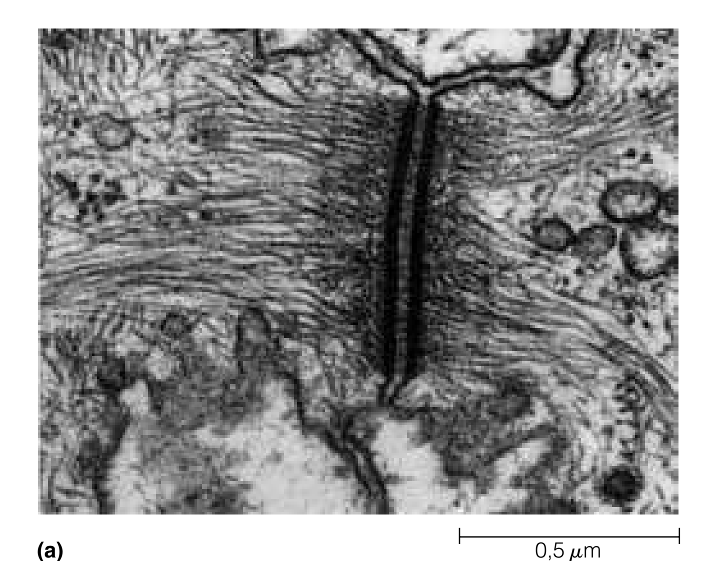


Figura 17A.1 Bacterias patógenas y proteínas de adhesión celular. Las bacterias que invaden el revestimiento del tracto digestivo humano se unen a receptores de adhesión celular de la superficie de las células intestinales. **(a)** Las especies del género *Yersinia* expresan una proteína denominada invasina que se une a las integrinas que tienen la subunidad β_1 que se encuentran en las células del intestino. **(b)** *Listeria monocytogenes* expresa una proteína denominada internalina A que se une a la E-cadherina de las células intestinales. **(c)** *Listeria* en la superficie de células epiteliales en cultivo (SEM).



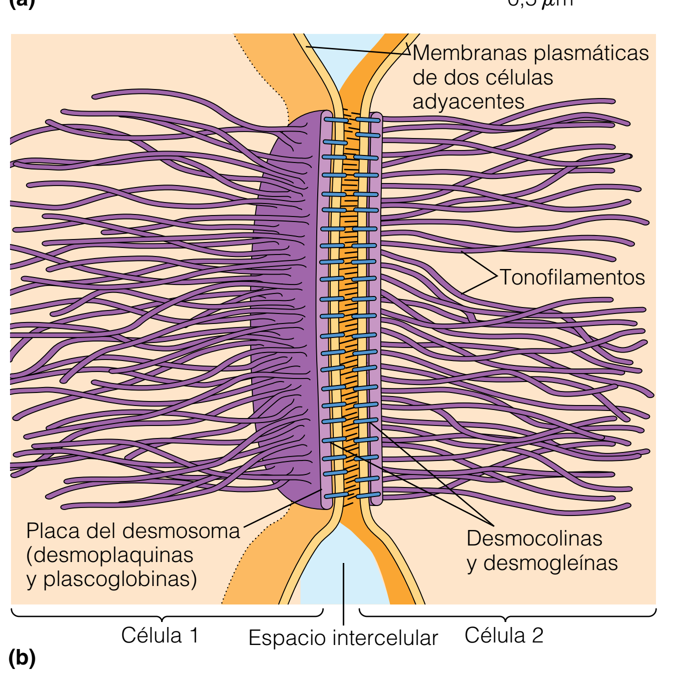


Figura 17.18 Estructura de los desmosomas. (**a**) Micrografía electrónica de un desmosoma que une dos células de la piel de un tritón (TEM). (**b**) Diagrama esquemático de un desmosoma. La distancia entre células en la región del desmosoma es de 25-35 nm, algo mayor que en las regiones sin unión. El núcleo del desmosoma entre las dos membranas está relleno de cadherinas (desmocolinas y desmogleínas). La placa en el lado citoplasmático de la membrana contiene desmoplaquinas y placoglobinas que se unen a tonofilamentos, que son filamentos intermedios compuestos por queratina, desmina o vimentina, dependiendo del tipo celular.

Los pacientes humanos que desarrollan reacciones autoinmunes contra componentes de sus desmosomas desarrollan enfermedades con ampollas de la piel conocidas como *pénfigo*. Algunos pacientes desarrollan anticuerpos contra desmogleínas, mientras que otros generan anticuerpos contra proteínas intermediarias, tales como la desmoplaquina.

Las uniones estrechas previenen el movimiento de moléculas a través de capas celulares

Como su propio nombre indica, una **unión estrecha** no deja espacio entre las membranas plasmáticas de células adyacentes (Figura 17.19). Las uniones estrechas sirven como precintos, previniendo el paso de fluidos —y por tanto el movimiento de moléculas e iones— entre las células de una capa celular que separa dos compartimentos del cuerpo. Las propiedades de las uniones estrechas se han estudiado por incubación de tejidos con moléculas trazadoras densas a los electrones y luego usando un microscopio electrónico para observar el movimiento del trazador a través del espacio extracelular. Como ilustra la Figura 17.20, las moléculas de trazador difunden en los reducidos espacios que quedan entre células adyacentes hasta que encuentran una unión estrecha, que bloquea su movimiento más allá de la unión.

Las uniones estrechas entre células adyacentes forman un cinturón continuo alrededor del revestimiento de un órgano o cavidad del cuerpo de forma que los espacios entre las células están sellados estrechamente (Figura 17.19a). El único camino para que las moléculas crucen la capa celular es atravesando a las propias células, un proceso que está regulado por proteínas transportadoras de la membrana plasmática.

Las uniones estrechas son especialmente abundantes en las células epiteliales intestinales, que deben formar una barrera efectiva para que el líquido del intestino no pueda atravesar la capa epitelial. Las uniones estrechas son también abundantes en los conductos y cavidades de las glándulas, tales como el hígado y el páncreas, que conectan con el tracto digestivo, así como en la vejiga urinaria, donde aseguran que la orina almacenada no se filtre entre las células.

Estructura de las uniones estrechas. Aunque las uniones estrechas sellan las membranas de células adyacentes de modo muy efectivo, las membranas, en realidad, no están en contacto estrecho en amplias áreas. Por el contrario, sólo se conectan a largo de crestas definidas abruptamente (Figura 17.19b). Las uniones estrechas pueden verse especialmente bien mediante microscopía electrónica en preparados por congelación y criofractura, que revelan la cara interna de las membranas. Las uniones aparecen como una serie de crestas que forman una red interconectada que se extiende a lo largo de la unión (Figura 17.19c). Cada cresta se compone de una hilera de proteínas transmembrana de unión, empaquetadas densamente de alrededor de 3-4 nm de diámetro. El resultado es, más bien, como situar dos piezas de metal corrugado juntas, de modo que sus crestas se alineen y fusionen las dos piezas a lo largo de cada cresta de contacto. Las crestas fusionadas eliminan el espacio intercelular y sellan la unión de modo efectivo, creando una barrera que impide el paso de fluidos extracelulares por los espacios entre células adyacentes. No es sorprendente, que el número de crestas a lo largo de una unión se correlacione bien con la intensidad del sellado que proporciona la unión.

Células epiteliales adyacentes

Unión estrecha

(a)

Espacio intercelular

Membranas plasmáticas de las dos células adyacentes

Crestas de proteínas de unión transmembrana (claudinas y ocludinas)

Las uniones estrechas boquean el paso de moléculas del fluido extracelular

Las uniones estrechas bloquean la difusión de moléculas de la membrana plasmática

(b)

Lumen

Uniones estrechas en la cara P de una membrana congelada y fracturada

(c)

0,5 μm

Figura 17.19 Estructura de las uniones estrechas. (**a**) Representación esquemática de células epiteliales adyacentes unidas entre sí mediante uniones estrechas. (**b**) Las proteínas transmembrana de unión en la membrana plasmática de dos células adyacentes están agrupadas a lo largo de puntos de contacto formando puentes de partículas proteicas que unen estrechamente las dos membranas plasmáticas. Las uniones estrechas evitan el paso de moléculas extracelulares a través de los espacios entre las células (flechas rojas), y también bloquean el movimiento lateral de las proteínas transmembrana. (**c**) Micrografía electrónica que ilustra uniones estrechas entre células de la vejiga urinaria de la rana como se observan mediante la técnica de criofractura. Las uniones estrechas se observan como puentes que hacen relieve en la cara protoplásmica (P) de la membrana. El lumen es la cavidad de la vejiga (TEM).

Se han identificado dos clases diferentes de proteínas de membrana, *claudinas* y *ocludinas*, como los componentes proteicos más importantes de las uniones estrechas. Cada una tiene cuatro dominios transmembrana, y se cree que las ocludinas y las claudinas de la membrana plasmática de células adyacentes se entrelazan formando un sellado estre-

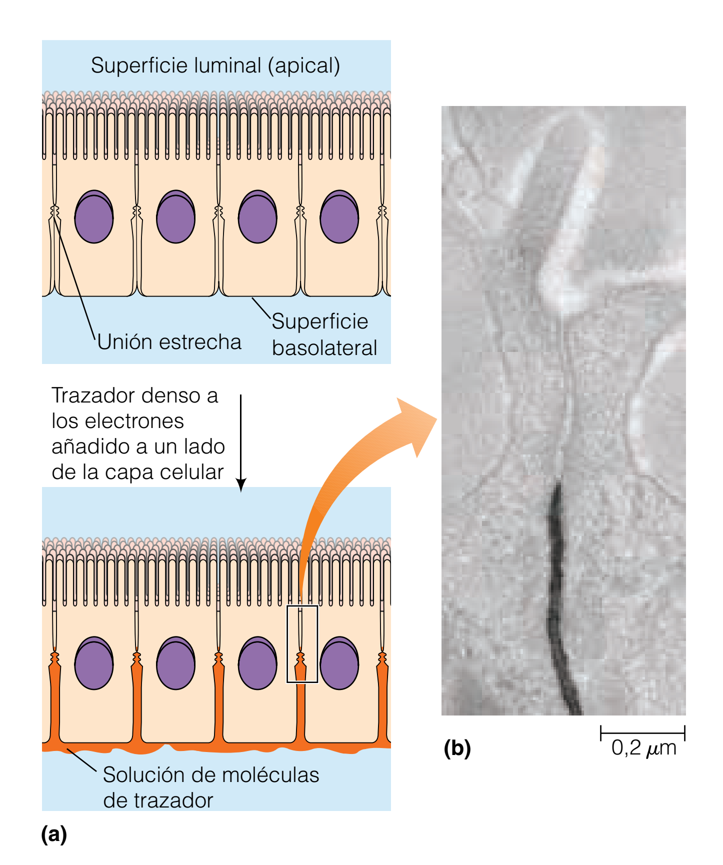


Figura 17.20 Evidencias experimentales que demuestran que las uniones estrechas crean una barrera de permeabilidad. (**a**) Cuando se añade un trazador denso a los electrones al espacio extracelular en uno de los lados de una capa de células epiteliales, las moléculas de trazador penetran en el espacio entre células adyacentes sólo hasta el punto donde encuentran una unión estrecha. (**b**) A causa de que las moléculas de trazador son densas a los electrones, su penetración en el espacio intercelular pueden ser visualizados por microscopía electrónica (TEM).

cho. Las **claudinas** parecen ser las más importantes de las dos proteínas para la formación de una unión estrecha. Cuando las células que no forman uniones estrechas son forzadas a expresar claudinas, forman uniones son muy similares a las uniones estrechas. Las claudinas constituyen una gran familia de proteínas; en distintos tejidos epiteliales se expresan diferentes claudinas, y se piensa que diferentes claudinas pueden influenciar el grado de sellado o de filtración de las uniones estrechas en tejidos concretos.

Papel de las uniones estrechas en el bloqueo del movimiento lateral de proteínas de membrana. Las uniones estrechas actúan como «compuertas», que previenen el movimiento de fluidos, iones y moléculas entre células. Además, las uniones estrechas actúan como «vallas», que bloquean el movimiento lateral de lípidos y proteínas dentro de la membrana. El movimiento de lípidos se bloquea sólo en la monocapa más externa, pero el movimiento de proteínas integrales de membrana se bloquea completamente. Como resultado, se puede mantener diferentes clases de proteínas integrales de membrana a ambos lados de la membrana separados por un cinturón de uniones estrechas. De este modo, las uniones estrechas ayudan a mantener polarizada la membrana plasmática de una célula epitelial, esto es, organizada en dominios funcionales discretos en extremos opuestos de la célula.

Las uniones comunicantes o de tipo nexo permiten la comunicación eléctrica y química directa entre células

Una unión comunicante, de tipo nexo o de tipo GAP es una región en la que las membranas plasmáticas de dos células están alineadas y puestas en contacto íntimo, con un espacio de sólo 2-3 nm entre ellas. La unión comunicante proporciona un punto de contacto citoplasmático entre dos células adyacentes a través del cual pueden pasar los iones y las moléculas pequeñas. Las células adyacentes están así en comunicación eléctrica y química directa entre sí.

La estructura de las uniones comunicantes se ilustra en la Figura 17.21. En una unión tipo GAP, las dos membranas plasmáticas de las células adyacentes están unidas por cilindros huecos y empaquetados estrechamente denominados **conexones.** Una única unión comunicante puede estar compuesta desde sólo unos pocos hasta más de mil conexones agrupados. En vertebrados, cada conexón está compuesto por seis subunidades de la proteína conexina ensambladas circularmente. Hay muchas conexinas diferentes (más de una docena) que se encuentran en diferentes tejidos, pero todas funcionan de manera similar en la formación de conexones. La agrupación atraviesa la membrana y sobresale al espacio entre las dos células (Figura 17.21a). Cada conexón tiene un diámetro de alrededor de 7 nm y un hueco central que forma un canal hidrofílico muy fino a través de la membrana. El canal tiene alrededor de 3 nm de diámetro en su punto más estrecho, lo suficientemente grande como para permitir el paso de iones y moléculas pequeñas. Los invertebrados no tienen conexinas. En su lugar, producen unas proteínas denominadas inexinas que parecen tener la misma función en las uniones comunicantes.

Cuando los conexones de la membrana plasmática de dos células adyacentes están alineados, los cilindros de las dos membranas se encuentran extremo con extremo, formando canales de comunicación directa entre las dos células que pueden ser observados con un microscopio electrónico (Figura 17.21b y c).

Se puede mostrar, mediante inyecciones de moléculas fluorescentes dentro de células conectadas por uniones comunicantes, que este tipo de uniones permiten el paso de solutos con pesos moleculares de hasta aproximadamente 1.200. Incluidas en este rango se encuentran sustancias tan comunes como monosacáridos, aminoácidos y nucleótidos —moléculas relacionadas, la mayoría de ellas, con el metabolismo celular—. El Problema 17.9 del final del capítulo le da la oportunidad de considerar este enfoque experimental con más detalle.

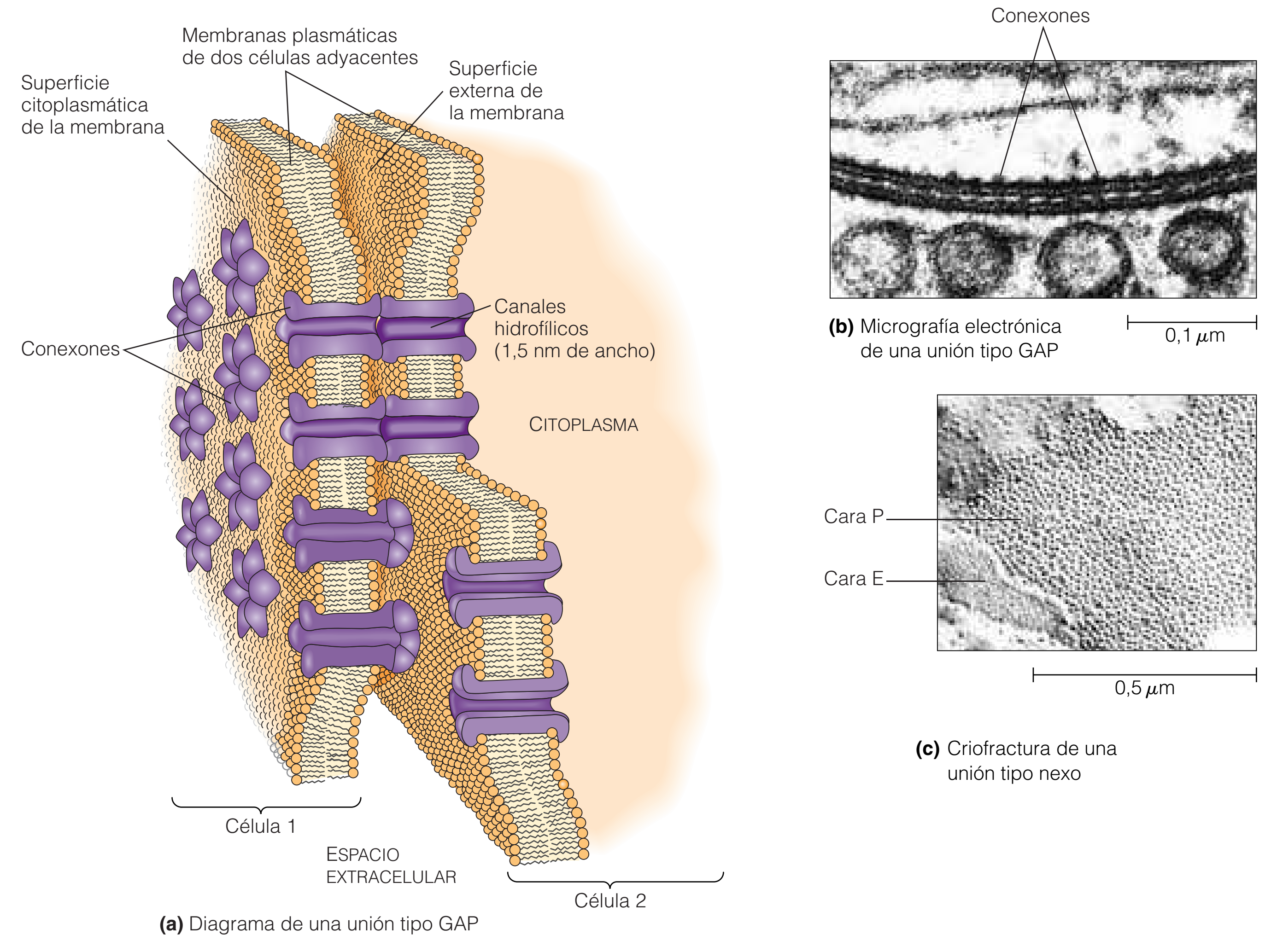
Las uniones comunicantes se encuentran en la mayoría de los tipos celulares de vertebrados e invertebrados. Son especialmente abundantes en tejidos como el muscular y el nervioso, donde se requiere comunicación extremadamente rápida entre células (recuerde que las uniones comunicantes son importantes en las sinapsis eléctricas; *véase* Capítulo 13). En el tejido cardíaco, las uniones comunicantes facilitan el flujo de corriente eléctrica que permite al corazón latir; en el cerebro, se concentran en el cerebelo, que está relacionado con la coordinación de las actividades musculares rápidas. Estas funciones se confirman analizando mutaciones en conexinas e inexinas. Por ejemplo, los ratones que carecen de un tipo concreto de conexinas tienen defectos en la conducción de impulsos eléctricos en el corazón.

La superficie de las células vegetales

Hasta ahora hemos centrado nuestra atención en la superficie de las células animales. La superficie de las células vegetales, algas, hongos y bacterias exhiben algunas de las mismas propiedades, pero también tienen varias características únicas. En lo que queda de capítulo, consideraremos algunas de las características distintivas de la superficie de las células vegetales.

Las paredes celulares proporcionan un marco estructural y sirven como barrera de permeabilidad

Una de las características más notable de los vegetales es que carecen de huesos o estructuras de tipo esquelético y aun así exhiben una gran resistencia. Esta resistencia la aportan las paredes celulares rígidas que rodean a todas las células vegetales con excepción de los gametos y algunos zigotos. La presencia de la pared celular es uno de los factores que más



(a) Diagrama de una unión tipo GAP

(b) Micrografía electrónica de una unión tipo GAP

(c) Criofractura de una unión tipo nexo

Figura 17.21 Estructura de las uniones estrechas o de tipo GAP. (**a**) Representación esquemática de una unión tipo GAP. Una unión tipo GAP se compone de un gran número de canales hidrofílicos formados por la alineación de conexones en la membrana plasmática de dos células unidas. (**b**) Micrografía electrónica de una unión tipo GAP entre dos células nerviosas adyacentes. Los conexones, que se extienden a lo largo de las membranas, son visibles como proyecciones arrosariadas espaciadas 17 nm y situadas a ambos lados de la unión entre membranas. (**c**) Unión tipo GAP mostrada por la técnica de la criofractura. La unión aparece como un agregado de partículas intramembranosas en la cara protoplásmica (P) y una serie de depresiones en la cara exterior (E) de la membrana (TEM).

diferencia a los vegetales de los animales. Específicamente, la rigidez de las paredes hace que los movimientos celulares sean virtualmente imposibles. Al mismo tiempo, las robustas paredes celulares permiten a las células vegetales resistir la *turgencia* que se produce por la captación de agua. La turgencia es vital para las plantas porque supone mucha de la firmeza, del tejido vegetal y proporciona la fuerza conductora que subyace a la expansión celular.

La pared que rodea a las células vegetales es también una barrera de permeabilidad para moléculas grandes. Para agua, gases e iones, y pequeñas moléculas hidrosolubles tales como los azúcares o los aminoácidos, la pared celular no es un obstáculo significativo; estas sustancias difunden a través de la pared fácilmente. La pared celular normalmente permite el paso de moléculas globulares con pesos moleculares grandes de alrededor de 20.000. Sin embargo, el paso de moléculas mayores de este tamaño es muy difícil o incluso está completamente impedido. No es sorprendente, que las hormonas que sirven como señales intracelulares en vegetales sean sin excepción moléculas pequeñas, con pesos moleculares por debajo de los 1000.

La pared celular vegetal es una red de microfibrillas de celulosa, polisacáridos y glicoproteínas

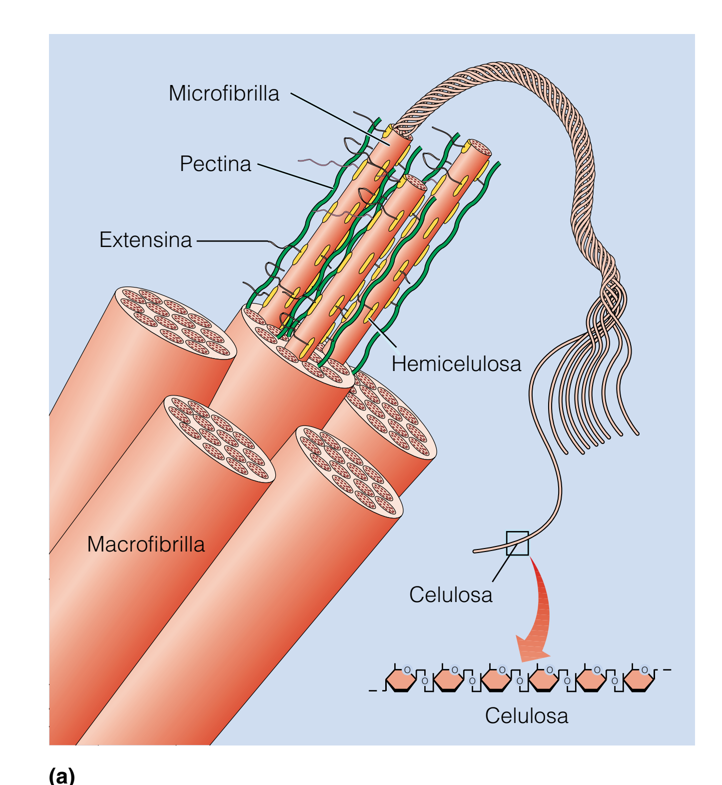
Al igual que la matriz extracelular de las células animales, la pared de las células vegetales se compone fundamentalmente de largas fibras embebidas en una red de moléculas ramificadas. Sin embargo, en lugar de colágeno y proteoglicanos, la pared de las células vegetales contiene *microfibrillas de celulosa* enredadas en una compleja red de polisacáridos ramificados y glicoproteínas denominadas *extensinas*

(*véase* Tabla 17.1). Los dos principales tipos de polisacáridos son *hemicelulosa* y *pectinas*. En función del peso seco, la celulosa, por lo general, supone más del 40% de la pared celular, la hemicelulosa alrededor del 20%, las pectinas representan aproximadamente el 30% y las glicoproteínas suponen otro 20%. La Figura 17.22a ilustra la relación entre estos componentes de la pared celular. La celulosa, la hemicelulosa y las glicoproteínas están unidas formando una red rígida interconectada que está embebida en una matriz de pectina. No se muestran las ligninas, que en el tejido leñoso se localizan entre las fibrillas de celulosa y hacen a la pared especialmente fuerte y rígida. Consideraremos por partes cada uno de estos componentes.

Celulosa y hemicelulosa. El polisacárido predominante de la pared celular vegetal es la **celulosa**, que es la macromolécula orgánica más abundante de la Tierra. Como vimos en el Capítulo 3, la celulosa es un polímero sin ramificar que se compone de miles de unidades β-D-glucosa unidas por enlaces $\beta(1 \rightarrow 4)$ (*véase* Figura 3.25). Las moléculas de celulosa son estructuras largas, parecidas a una cinta que se estabilizan por puentes de hidrógeno intramoleculares. Muchas de estas moléculas (generalmente, 50-60) se asocian paralelamente para formar las **microfibrillas** que se encuentran en las paredes celulares. Con frecuencia, las microfibrillas de celulosa se enrollan entre sí en forma de cuerda para generar estructuras aún más grandes, denominadas **macrofibrillas** (*véase* Figura 17.22a). ¡Las macrofibrillas de celulosa son tan fuertes como una pieza de acero de tamaño equivalente!

A pesar del nombre, las hemicelulosas son estructural y químicamente distintas de la celulosa. Las hemicelulosas son un grupo heterógeneo de polisacáridos, compuestos por una cadena larga y lineal de una única clase de azúcar (glucosa o xilosa) con cadenas laterales cortas unidas para formar una red rígida (Figura 17.22a). Las cadenas laterales generalmente contienen varias clases diferentes de azúcares, incluyendo las hexosas glucosa, galactosa y manosa, y las pentosas xilosa y arabinosa.

Otros componentes de la pared celular. Además de la celulosa y la hemicelulosa, las paredes celulares tienen otros muchos componentes importantes. Las **pectinas** son también polisacáridos ramificados, pero con ejes denominados *rhamnogalacturononas* que se componen principalmente de ramnosa y ácido galacturonónico cargado negativamente. Las cadenas laterales ancladas al eje contienen algunos de los mismos monosacáridos que se encuentran en las hemicelulosas. Las moléculas de pectina forman la matriz en la cual se embeben las microfibrillas de celulosa (*véase* Figura 17.22a). Además, unen paredes celulares que están juntas. A causa de su estructura altamente ramificada y su carga negativa, las pectinas atrapan y unen moléculas de agua. Como resultado, las pectinas tienen una consistencia parecida a un gel. (Debido a su capacidad para formar geles, las pectinas se añaden a los zumos de fruta en los procesos de fabricación de mermeladas y gelatinas de fruta.)



(a)

(b) 0,25 μm

Figura 17.22 Componentes estructurales de la pared vegetal. (**a**) Las microfibrillas de celulosa se unen mediante hemicelulosas y glicoproteínas denominadas extensinas para formar una red rígida interconectada embebida en una matriz de pectinas. Las microfibrillas de celulosa suelen estar enrolladas entre sí formando grandes estructuras denominadas macrofibrillas. (No se muestran las ligninas que se localizan entre las microfibrillas de celulosa en tejidos leñosos.) (**b**) Micrografía electrónica que muestra microfibrillas individuales de celulosa en la pared celular de un alga verde. Todas las microfibrillas están compuestas por muchas moléculas de celulosa alineadas paralelamente (TEM).

Además de hemicelulosas y pectinas, las paredes celulares también contienen un grupo de glicoproteínas relacionadas denominadas **extensinas.** A pesar del nombre, las extensinas no son muy extensibles; en realidad son moléculas rígidas, parecidas a una barra que están tejidas estrechamente en la compleja red de polisacáridos de la pared celular (*véase* Figura 17.22a). De hecho, las extensinas están tan integradas en la matriz de la pared celular que intentar extraerlas químicamente generalmente acaba en la pérdida de la estructura de la pared celular. Inicialmente las extensinas se depositan en la pared celular de forma soluble. Sin embargo, una vez depositadas, las moléculas de extensina se unen covalentemente entre sí y a la celulosa, generando un complejo proteína-polisacárido reforzado. Las extensinas son poco abundantes en las paredes celulares de tejidos activos en crecimiento y más abundantes en las paredes celulares de tejidos que proporcionan soporte mecánico a la planta.

Las **ligninas** son polímeros muy insolubles de alcoholes aromáticos que están presentes principalmente en tejidos leñosos. (La palabra latina para «leñoso» es *lignum*) Las moléculas de lignina se localizan principalmente entre las fibrillas de celulosa, donde actúan para resistir las fuerzas de compresión. La lignina supone más del 25% del peso seco de las plantas leñosas, siendo el segundo componente orgánico más abundante de la Tierra después de la celulosa.

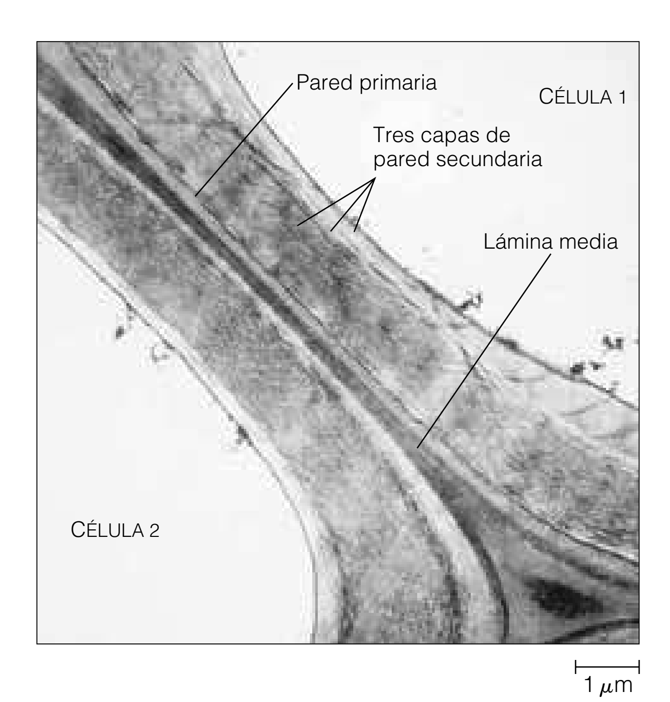


Figura 17.23 **La lámina media.** La lámina media es una capa de material de la pared celular compartida por dos células vegetales adyacentes. La lámina media está compuesta principalmente por pectinas adhesivas y une a las células estrechamente.

Las paredes celulares se sintetizan en numerosos pasos

Los componentes de la pared celular vegetal se van secretando paso a paso, creándose una serie de capas, de tal modo que la primera capa en ser sintetizada termina más lejos de la membrana plasmática. La primera estructura en ser depositada se denomina **lámina media**; ésta se comparte entre paredes celulares vecinas y mantiene juntas a las células adyacentes (Figura 17.23). La siguiente estructura en ser formada se denomina **pared celular primaria**, la cual se forma cuando las células están todavía en crecimiento. Las paredes primarias tienen un espesor de aproximadamente 100-200 nm, solamente algo más espesa que la lámina basal de las células animales. La pared celular primaria se compone de una red de microfibrillas de celulosa organizada laxamente y asociadas con hemicelulosa, pectinas y glicoproteínas (Figura 17.24a). Las microfibrillas de celulosa se generan por complejos enzimáticos sintetizadores de celulosa denominados *rosetas* que están localizados dentro de la membrana plasmática. Como las microfibrillas se anclan a otros componentes de la pared, las rosetas deben moverse en el plano de la membrana mientras alargan las microfibrillas de celulosa en crecimiento.

Cuando los brotes o raíces de una planta están creciendo, las paredes celulares deben remodelarse. Una familia de proteínas denominadas *expansinas* ayuda a las paredes celulares a conservar su flexibilidad. Cuando se añaden a componentes desnaturalizados de la pared celular mantenidos a un pH ácido, las expansinas permiten a esas paredes celulares extenderse mucho más fácilmente que en su ausencia. Un modo en el que pueden actuar las expansinas es interrumpiendo los puentes de hidrógeno normales de los glicanos dentro de las microfibrillas de la pared celular para permitir la reorganización de las microfibrillas.

La organización laxa de la pared celular primaria crea una estructura fina y flexible que puede expandirse durante el crecimiento celular. En algunas células vegetales, el desarrollo de la pared celular no prosigue más allá de este punto. Sin embargo, muchas células que han detenido su crecimiento añaden un conjunto de capas más espesas y rígidas a las que se denominan como **pared celular secundaria** (Figura 17.24b). Los componentes de la pared secundaria multilaminar se añaden a la superficie interna de la pared primaria después de que el crecimiento celular haya cesado. La celulosa y las ligninas son los principales componentes de la pared secundaria, haciendo a esta estructura significativamente más fuerte, dura y rígida que la pared primaria. Cada capa de la pared secundaria está compuesta por haces de microfibrillas de celulosa empaquetados densamente, organizados en paralelo y orientados de tal manera que forman un cierto ángulo con las microfibrillas de capas adyacentes. Esta organización aporta gran resistencia mecánica y rigidez a la pared celular secundaria.

Cuando las paredes secundarias se forman, los microtúbulos localizados por debajo de la membrana plasmática se orientan en la misma dirección que las microfibrillas de celulosa recién formadas, y las rosetas que sintetizan celu-

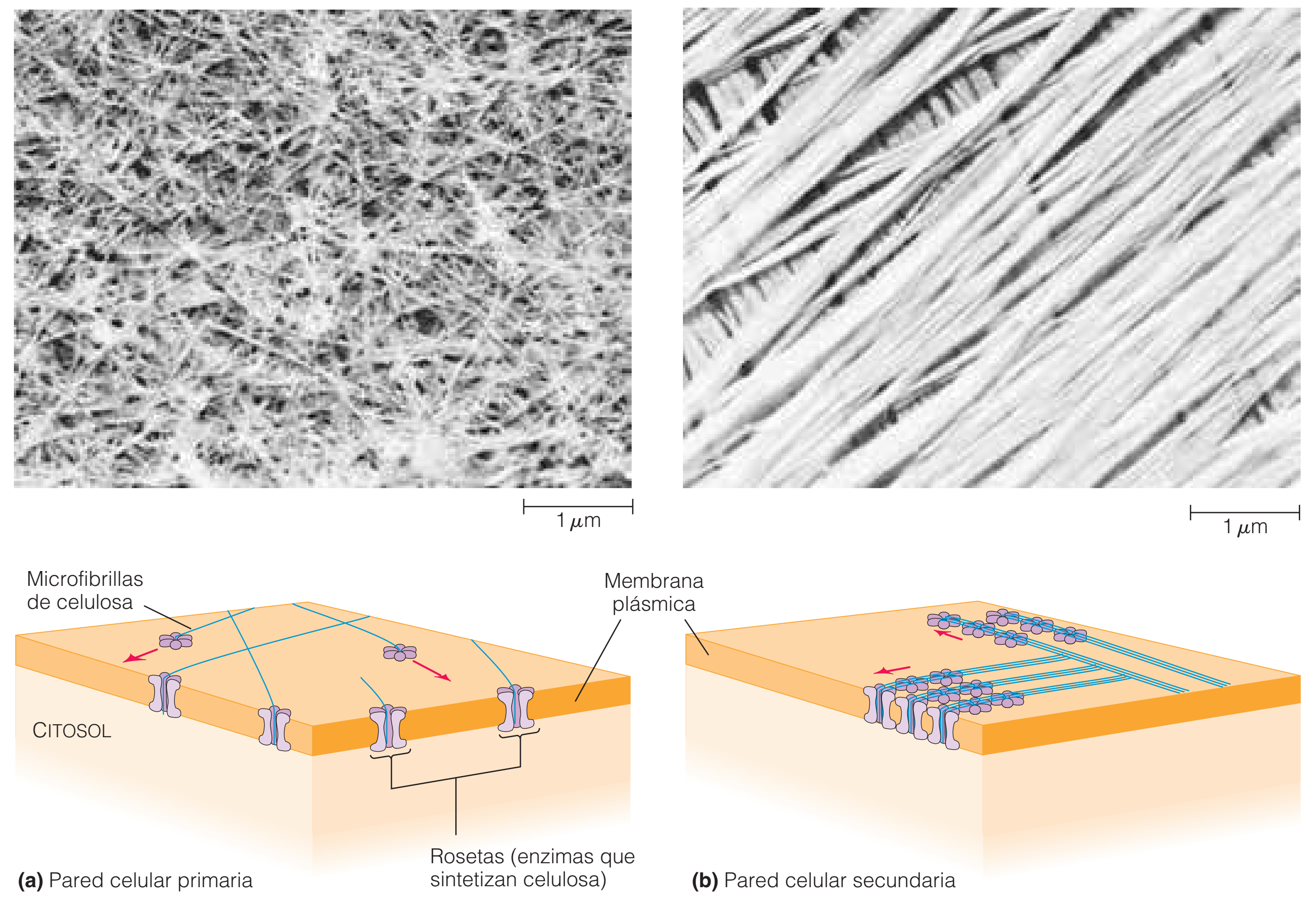


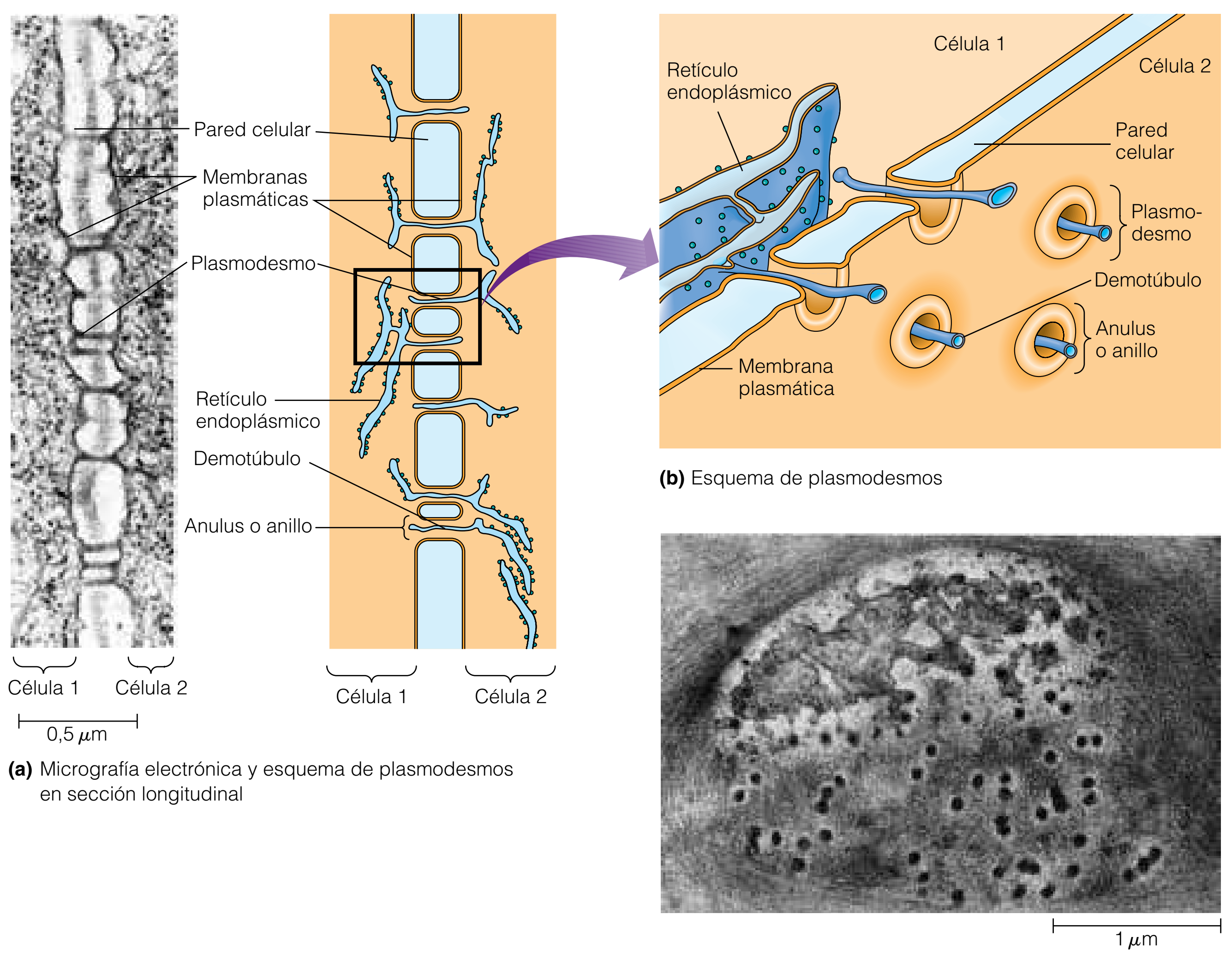
Figura 17.24 Microfibrillas de celulosa de las paredes vegetal primaria y secundaria. (**a**) *Pared celular primaria*: micrografía electrónica que muestra las microfibrillas celulares organizadas laxamente de una pared celular primaria; el diagrama representa cómo se sintetizan las microfibrillas celulares por las rosetas, cada una de las cuales es una asociación de enzimas que sintetizan celulosa y que están embebidas en la membrana plasmática. Cuando una roseta sintetiza un fascículo de moléculas de celulosa, se mueve a través de la membrana plasmática en la dirección indicada por las flechas. (**b**) *Pared celular secundaria*: la micrografía electrónica muestra macrofibrillas de celulosa empaquetadas densamente y orientadas paralelamente; el diagrama representa cómo las rosetas forman agregados densos que sintetizan un gran número de microfibrillas paralelas, generando macrofibrillas celulares (TEMs).

losa se agregan en grandes conjuntos que contienen docenas de rosetas. Se cree que los microtúbulos subyacentes guían el movimiento de estos agregados de rosetas, que sintetizan grandes haces paralelos de microfibrillas de celulosa mientras se mueven.

Los plasmodesmos permiten la comunicación directa célula-célula a través de la pared celular

Puesto que cada célula vegetal está rodeada por una membrana plasmática y una pared celular, podría peguntarse si es posible la comunicación intercelular entre células vegetales semejante a la proporcionada por las uniones tipo nexo en las células animales. Efectivamente, las células vegetales, poseen estructuras que lo permiten. Como se muestra en la Figura 17.25, los **plasmodesmos** son canales citoplasmáticos a través de grandes aperturas de la pared celular, permitiendo la continuidad de la membrana plasmática de dos células adyacentes. Cada plasmodesmo está por tanto revestido de la membrana plasmática común de las dos células conectadas. Un plasmodesmo tiene forma cilíndrica, con el diámetro más estrecho en ambos extremos. El diámetro del canal varía aproximadamente desde 20 hasta 200 nm. Una única estructura tubular, el *desmotúbulo*, generalmente descansa en el canal central del plasmodesmo. Con frecuencia, las cisternas del retículo endoplasmático (ER) se observan a ambos lados de la pared celular cerca de los plasmodesmos. Las membranas del ER de células adyacentes son continuas con los desmotúbulos y con el ER de las otras células, como se representan en la Figura 17.25b.

El anillo de citoplasma entre el desmotúbulo y la membrana que limita al plasmodesmo se denomina el *anulus o anillo*. Se piensa que el anillo proporciona continuidad citoplásmica entre células adyacentes, permitiendo por tanto, el paso de moléculas libremente de una célula a la de al



(a) Micrografía electrónica y esquema de plasmodesmos en sección longitudinal

(b) Esquema de plasmodesmos

(c) Micrografía electrónica de plasmodesmos en sección transversal

Figura 17.25 Plasmodesmos. Un plasmodesmo es un canal que atraviesa la pared celular entre dos células vegetales adyacentes, permitiendo el intercambio citoplasmático entre las células. En los plasmodesmos, la membrana plasmática de una célula continúa con la de la otra célula. La mayoría de plasmodesmos tienen un desmotúbulo estrecho y cilíndrico en el centro, derivado del ER y que parece estar en continuidad con el ER de ambas células. El anillo es estrecho canal anular de citoplasma existente entre los desmotúbulos y la membrana plasmática que delimita los plasmodesmos. (**a**) La micrografía electrónica y el diagrama muestran la pared celular entre dos células adyacentes de la raíz de hierba, con muchos plasmodesmos (TEM). (**b**) Visión esquemática de una pared celular con muchos plasmodesmos, ilustrando la continuidad entre células adyacentes del ER y el citoplasma. (**c**) Micrografía electrónica que muestra numerosos plasmodesmos en sección transversal (TEM).

lado. De esta manera los plasmodesmos proporcionan continuidad de la membrana plasmática, el ER y el citoplasma entre células adyacentes. Incluso después de la división celular y el depósito de nuevas paredes celulares entre las dos células hijas, las continuidades citoplasmáticas se mantienen entre las células hijas por plasmodesmos que atraviesan las paredes recién formadas. De hecho, la mayoría de plasmodesmos se forman al mismo tiempo que tiene lugar la división celular, cuando la nueva pared está siendo formada. Más tarde pueden tener lugar cambios más pequeños, pero el número y la localización de los plasmodesmos se fijan fundamentalmente durante la división.

En muchos aspectos, los plasmodesmos parecen tener una función similar a las uniones tipo nexo. Reducen aproximadamente 50 veces la resistencia eléctrica entre células adyacentes, en comparación con las células que están completamente separadas por las membranas plasmáticas. De hecho, el movimiento de iones entre células adyacentes (medido en flujo de corriente) es proporcional al número de plasmodesmos que conectan las células. Al igual que en las uniones tipo GAP, el calcio parece regular el movimiento a través de los plasmodesmos, ya que el tráfico entre células puede reducirse significativamente si se inyecta Ca^{2+} en el interior de las mismas.

Perspectiva

Tanto las células animales como las vegetales tienen estructuras extracelulares que consisten en fibras largas y rígidas embebidas en una matriz amorfa e hidratada de moléculas ramificadas. En el caso de las células animales, la matriz extracelular (ECM) se compone de fibras de colágeno (y, en algunos tejidos, elastina) embebidas en una red de glicosaminoglicanos y proteoglicanos. El colágeno es responsable de la resistencia de la ECM y la elastina proporciona elasticidad. La ECM se mantiene en su lugar gracias a glicoproteínas adhesivas como las fibronectinas, que unen células a la ECM, y las lamininas, que fijan células a la lámina basal. Estas glicoproteínas adhesivas se unen a receptores de glicoproteínas de la superficie celular denominados integrinas. El reconocimiento y adhesión célula-célula está mediado por glicoproteínas de la membrana plasmática como las proteínas IgSF y las cadherinas. Los carbohidratos de la superficie celular también son importantes en el reconocimiento y adhesión célula-célula; un ejemplo es el papel de las selectinas en el reconocimiento de los carbohidratos durante las respuestas inflamatorias. La mayoría de células de los organismos multicelulares asociación cercana y continua con células próximas. Las uniones que conectan a las células animales entre sí pertenecen a tres tipos generales. Las uniones adherentes mantienen a las células juntas en posiciones fijas dentro de los tejidos o unen células a la ECM. En la cara citoplasmática de la membrana, las uniones adherentes se anclan al citoesqueleto mediante proteínas que se fijan a microfilamentos de actina (uniones adherentes) o filamentos intermedios (desmosomas y hemidesmosomas). Los desmosomas son especialmente abundantes en tejidos que deben soportar un estrés mecánico considerable.

Las uniones estrechas forman una barrera de permeabilidad entre las células epiteliales, por tanto, restringen el movimiento de solutos a través del tejido. Las uniones estrechas también previenen el movimiento lateral de proteínas de membrana, y por tanto, dividen las membranas en dominios funcionales discretos. Las uniones comunicantes o de tipo GAP forman canales abiertos entre las células, permitiendo la comunicación eléctrica y química directa entre ellas. La permeabilidad de las uniones tipo GAP se limita a iones y pequeñas moléculas y depende de las concentraciones de Ca^{2+} y protones.

La pared celular primaria de una célula vegetal se compone principalmente de fibras de celulosa embebidas en una compleja red de hemicelulosas, pectinas y extensinas. La pared celular secundaria que se forma cuando una célula alcanza su forma y tamaño definitivo y se refuerza por ligninas, un componente principal de la leña. Los plasmodesmos son canales citoplasmáticos recubiertos de membrana entre células vegetales adyacentes que permiten la comunicación química y eléctrica entre ellas, casi del mismo modo que las uniones tipo GAP en las células animales.

Problemas

Los problemas de mayor dificultad están marcados con un •.

17.1 Más allá de la membrana: ECM y paredes celulares. Compare y contraste la matriz extracelular (ECM) de las células animales con las paredes que rodean a las células vegetales.

(a) ¿Qué principio de organización básica subyace tanto a la ECM como a las paredes celulares?

(b) ¿Cuáles son los componentes químicos en cada caso?

(c) ¿Qué funciones comparten la ECM y la pared celular?

(d) ¿Qué papeles son exclusivos de la ECM? ¿Y de la pared celular?

17.2 Anclando células a la ECM. De acuerdo con nuestro conocimiento actual, las células animales se unen a la ECM mediante muchas clases diferentes de proteínas que median estas uniones.

(a) ¿Cuáles son las dos principales clases de uniones? ¿Cómo podrías diferenciarlas experimentalmente, teniendo en cuenta las proteínas que participan en ellas?

(b) Explique brevemente cómo los distintos dominios de la molécula de fibronectina (*véase* Figura 17.9) o de la molécula de laminina son importantes para su función.

17.3 Compare y contraste. Para cada uno de los términos de la lista A, elija un término relacionado de la lista B y explique la relación entre los dos términos bien sea por su semejanza o su diferencia estructural o funcional.

Lista A	Lista B
(a) Colágeno	**(a)** Superficie basolateral
(b) Fibronectina	**(b)** Adhesión focal
(c Integrina	**(c)** Elastina
(d) IgSF	**(d)** Laminina
(e) ECM	**(e)** Cadherina
(f) Hemidesmosoma	**(f)** Glicocálix
(g) Superficie apical	**(g)** Selectina

17.4 Compactación. En los embriones de mamíferos como por ejemplo en el ratón, los óvulos fertilizados se dividen tres veces para formar ocho células empaquetadas de forma laxa, que se adhieren estrechamente en un proceso conocido como *compactación.* A finales de los años 70, varios laboratorios fabricaron anticuerpos contra proteínas de la superficie células de los ratones. Los anticuerpos impedían la compactación, al igual que la retirada de Ca^{2+} del medio. ¿Qué clases de proteínas reconocen probablemente estos anticuerpos, y por qué?

17.5 Uniones celulares y plasmodesmos. Indique si cada una de las siguientes afirmaciones es verdadera para las uniones adherentes (A), las uniones estrechas (T), las uniones comunicantes o de tipo GAP (G), y/o los plasmodesmos (P). Las afirmaciones pueden ser ciertas para alguna, todas o ninguna (N) de estas estructuras.

(a) Se asocian con filamentos que confieren tanto propiedades contráctiles como de tensión.

(b) Los sitios de fusión de membrana están limitados por crestas contiguas de membranas adyacentes.

(c) Requiere la alineación de conexones en la membrana plasmática de dos células adyacentes.

(d) Sella estrechamente las membranas de dos células adyacentes entre sí.

(e) Permite el intercambio de metabolitos entre el citoplasma de dos células adyacentes.

17.6 Proteínas de unión. Indique si cada una de las siguientes proteínas o estructuras es un componente de las uniones adherentes (A), de las uniones estrechas (T), de las uniones comunicantes o tipo GAP (G), o de los plasmodesmos (P), y describa brevemente el papel que desempeña la proteína en la unión.

(a) Conexina

(b) Vinculina

(c) Desmocolinas

(d) Desmotúbulo

(e) Desmoplaquina

(f) Anillo o anulus

(g) Cadherinas

(h) Claudinas

17.7 Paredes celulares vegetales. Distinga entre los términos de cada uno de los siguientes pares respecto a las estructuras de la pared celular vegetal, e indique la importancia de cada una.

(a) Pared primaria; pared secundaria

(b) Celulosa; hemicelulosa

(c) Xilano; xiloglucano

(d) Extensina; lignina

(e) Desmotúbulo; anuus o anillo

(f) Plasmodesmo; unión tipo GAP

•**17.8 Escorbuto y colágeno.** El escorbuto es una enfermedad que hasta el siglo pasado fue común entre los marineros y otras personas cuyas dietas eran deficientes en vitamina C (ácido ascórbico). Los individuos con escorbuto sufren gran variedad de afecciones, incluyendo extensos moratones, hemorragias y la alteración de tejidos de soporte. El ácido ascórbico sirve como un agente reductor responsable de mantener la actividad de la hidroxilasa de prolina, una enzima que cataliza la hidroxilación de los residuos de prolina dentro de la triple hélice de colágeno, lo cual se requiere para la estabilidad de la hélice.

(a) Según esta información, postule una función para la hidroxiprolina en las triples hélices de colágeno y explique la secuencia de eventos que conducen hasta síntomas tales como moratones y la alteración de los tejidos de soporte a partir de una dieta deficiente en vitamina C.

(b) ¿Qué implicaciones tiene su respuesta sobre la degradación y reemplazamiento del colágeno en al menos algunos tejidos?

(c) ¿Puede proponer por qué los marineros ya no sufren de escorbuto?

•**17.9 Evidencias experimentales de las uniones tipo GAP.** Nuestro conocimiento sobre las uniones comunicantes o de tipo GAP se debe en gran parte al trabajo pionero de Werner Loewenstein y sus colaboradores, quienes desarrollaron los experimentos descritos más abajo, y representados en la Figura 17.26. En cada caso, indique (i) qué hipótesis quería comprobarse con el experimento diseñado, (ii) qué piensa que los investigadores concluyeron de los experimentos, (iii) cómo apoyan sus descubrimientos esta conclusión, y (iv) un experimento adicional que podría hacerse con la misma metodología para ampliar sus descubrimientos.

(a) Se insertaron microelectrodos en células individuales de las glándulas salivares de insectos. Cuando se aplicó un pequeño voltaje a los electrodos de dos células adyacentes,

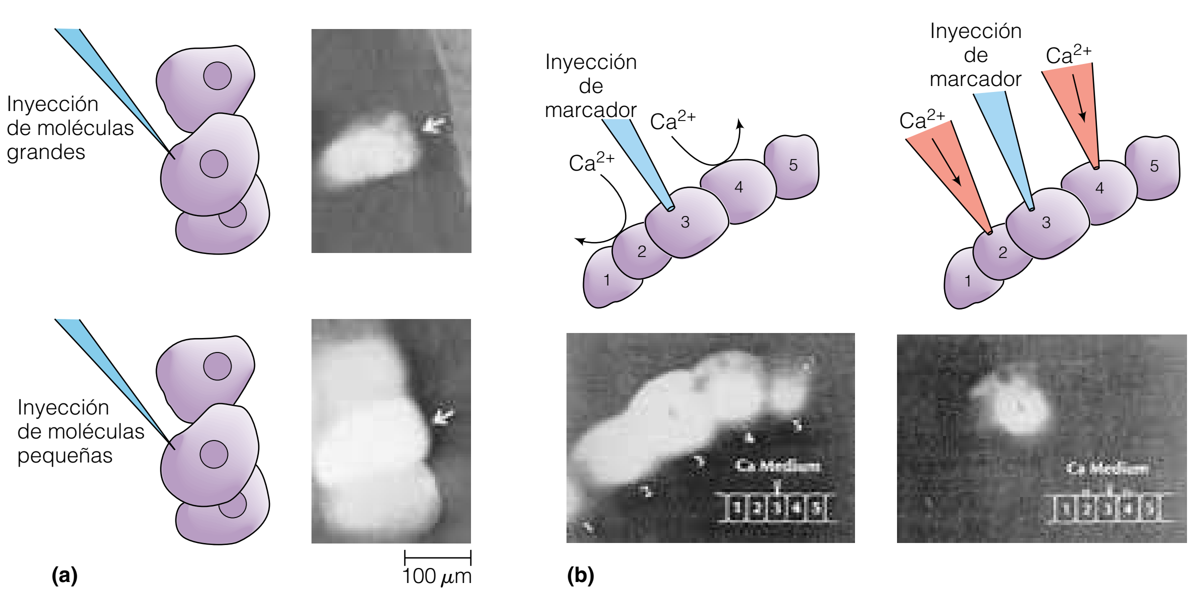


Figura 17.26 Evidencias experimentales de las propiedades de las uniones tipo GAP. (**a**) Limitaciones de tamaño en la permeabilidad a través de la unión tipo GAP determinada por microscopía de fluorescencia después de la microinyección de moléculas fluorescentes de dos tamaños distintos: 1926 Da (arriba) y 1158 Da (abajo). (**b**) Utilización de un marcador fluorescente para determinar cómo afectan los cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular a la permeabilidad de las uniones tipo GAP. *Véase* Problema 17.9.

se encontró que la corriente que fluía entre ellas era varios órdenes de magnitud mayor que la corriente que podría ser medida cuando se situó un electrodo entre una célula y otro en el medio externo.

(b) Se inyectaron las células con moléculas fluorescentes de diferentes pesos moleculares y se usó un microscopio de fluorescencia para observar el movimiento de las moléculas entre células adyacentes. La Figura 17.26a ilustra el resultado obtenido con las moléculas fluorescentes de pesos moleculares de 1.926 (arriba) y 1.158 (abajo).

(c) Se inyectó un marcador fluorescente en una célula (número 3) que forma parte de una secuencia de cinco células y se usó un microscopio de fluorescencia para monitorizar el movimiento del marcador hacia las células adyacentes en un medio que contiene Ca^{2+}. La Figura 17.26b ilustra el resultado obtenido con células intactas que son impermeables al Ca^{2+} (izquierda) y con orificios perforados en las células 2 y 4 para permitir que la solución que contiene Ca^{2+} entre, y por tanto, elevando la concentración intracelular de Ca^{2+} (derecha).

Bibliografía recomendada

Las referencias con importancia histórica están marcadas con •.

Referencias generales

Horwitz, A. F. Integrins and health. *Sci. Amer.* 276 (1997): 68.

Hynes, R. O. Targeted mutations in cell adhesion genes: What have we learned from them? *Dev. Biol.* 180 (1996): 402.

Hynes, R. O. Cell adhesion: Old and new questions. *Trends Cell Biol.* 9 (1999): M33.

Ridley, A. J., M. A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons y A. R. Horwitz. Cell migration: Integrating signals from front to back. *Science* 302 (2003): 1704-1709.

La matriz extracelular de las células animales

Colognato, H. y P. D. Yurchenco. Form and function: The laminin family of heterotrimers. *Dev. Dyn.* 218 (2000): 213.

Gorski, J. P. y B. R. Olsen. Mutations in extracellular matrix molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10 (1998): 586.

Kielty, C. M., M. J. Sherratt y C. A. Shuttleworth. Elastic fibres. *J. Cell Sci.* 115 (2002): 2817-2828.

Integrinas, contactos focales y hemidesmosomas

De Arcangelis, A. y E. George-Labouesse. Integrin and ECM functions: Roles in vertebrate development. *Trends Genet.* 16 (2000): 389.

Jones, J. C., S. B. Hopkinson y L. E. Goldfinger. Structure and assembly of hemidesmosomes. *Bioessays* 20 (1998): 488.

Kühn, K. y J. Eble. The structural bases of integrin-ligand interactions. *Trends Cell Biol.* 4 (1994): 256.

Miranti, C. K. y J. S. Brugge. Sensing the environment: A historical perspective on integrin signal transduction. *Nat. Cell Biol.* 4 (2002): E83-E90.

Parsons, J. T. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J. Cell Sci.* 116 (2003): 1409-1416.

Sheppard, D. Epithelial integrins. *Bioessays* 18 (1996): 655.

Adhesión célula-célula

Angst, B. D., C. Marcozzi y A. I. Magee. The cadherin superfamily: Diversity in form and function. *J. Cell Sci.* 114 (2001): 629.

Boyle, E. C. y B. B. Finlay. Bacterial pathogenesis: Exploiting cellular adherence. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 15 (2003): 633-639.

Cossart, P., J. Pizarro-Cerda y M. Lecuit. Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes:* Functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol.* 13 (2003): 23-31.

Leckband, D. y S. Sivasankar. Mechanism of homophilic cadherin adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12 (2000): 587.

Sharon, N. y H. Lis. Carbohydrates in cell recognition. *Sci. Amer.* 268 (enero de 1993): 82.

Vestweber, D. y J. E. Blanks. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol. Rev.* 79 (1999): 181.

Uniones celulares

Getsios, S., A. C. Huen y K. J. Green. Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 (2004): 271-281.

Mitic, L. L., C. M. Van Itallie y J. M. Anderson. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: Lessons from mutant animals and proteins. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279 (2000): G250.

North, A. J., W. G. Bardsley, J. Hyam, E. A. Bornslaeger, H. C. Cordingley, B. Trinnaman, M. Hatzfeld, K. J. Green, A. I. Magee y D. R. Garrod. Molecular map of the desmosomal plaque. *J. Cell Sci.* 112 (1999): 4325.

Phelan, P. y T. A. Starich. Innexins get into the gap. *Bioessays* 23 (2001): 388.

Simon, A. M. y D. A. Goodenough. Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends Cell Biol.* 8 (1998): 477.

Yap, A. S., W. M. Brieher y B. M. Gumbiner. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13 (1997): 119.

La pared celular vegetal y los plasmodesmos

Cosgrove, D. J. Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.* 13 (1997): 171.

Doblin, M. S., I. Kurek, D. Jacob-Wilk y D. P. Delmer. Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes. *Plant Cell Physiol.* 43 (2002): 1407-1420.

Li, Y., L. Jones y S. McQueen-Mason. Expansins and cell growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6 (2003): 603-610.

Showalter, A. M. Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5 (1993): 9.

Wyatt, S. E. y N. C. Carpita. The plant cytoskeleton-cell-wall continuum. *Trends Cell Biol.* 3 (1992): 413.

Zambryski, P. Cell-to-cell transport of proteins and fluorescent tracers via plasmodesmata during plant development. *J. Cell Biol.* 164 (2004): 165-168.

18

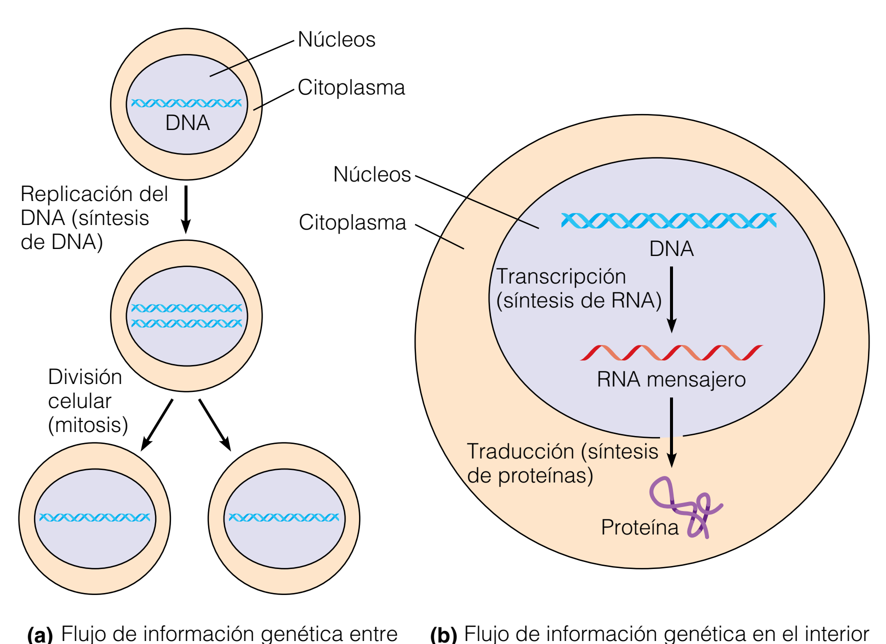
Base estructural de la información celular: DNA, cromosomas y el núcleo

En lo que hemos tratado hasta el momento sobre la estructura y la función celular, ha existido siempre, de forma implícita, un sentido del orden, del control y de lo previsible. Hemos llegado a esperar que los orgánulos y otras estructuras celulares tengan una apariencia y función previsibles, que las rutas metabólicas se realicen de manera ordenada en lugares intracelulares específicos y que el conjunto de las actividades celulares se realice de una forma extraordinariamente cuidadosa, controlada, eficaz y heredable.

Tales expectativas expresan nuestra confianza en que las células posean un conjunto de «instrucciones» que especifiquen su estructura, dicten sus funciones y regulen sus actividades, y que estas instrucciones se puedan transmitir fielmente a las células hijas. Hace más de cien años, el monje agustino Gregor Mendel desarrolló reglas que trataban sobre los patrones de herencia que observó en plantas de guisantes, aunque él tenía pocas nociones de las bases celulares o moleculares de estas reglas. Estos estudios condujeron a Mendel a concluir que la información hereditaria se transmitía en forma de unidades diferenciadas que en la actualidad llamamos **genes**. Actualmente, sabemos también que los genes consisten en secuencias de ADN que codifican productos funcionales que normalmente son cadenas proteicas, pero que en algunos casos pueden ser moléculas de RNA que no codifican proteínas.

La Figura 18.1 presenta un avance de cómo el DNA lleva a cabo su papel de instructor celular y cómo al mismo tiempo proporciona el marco para describir cómo se organiza este grupo de capítulos sobre el flujo de información. La figura destaca el hecho de que la información que lleva el DNA fluye *entre* generaciones de células y *dentro* de cada célula individual. Durante el primero de estos dos procesos (Figura 18.1a), la información almacenada en las moléculas de DNA de una célula se somete al proceso de la replicación, generando dos copias de DNA que se distribuyen a las células hijas cuando la célula se divide. Los tres capítulos iniciales de esta sección, están enfocados hacia las estructuras y acontecimientos asociados con este aspecto del flujo de la información. Este capítulo cubre la organización estructural del DNA y los cromosomas en los que se empaqueta; también trata sobre el núcleo, que es el orgánulo que aloja a los cromosomas de las células eucariotas. El Capítulo 19 trata sobre la replicación del DNA y la división celular, mientras que el Capítulo 20 considera los acontecimientos celulares y moleculares asociados con el flujo de la información entre generaciones de organismos con reproducción sexual (incluyendo los trabajos de Mendel y su base cromosómica).

La Figura 18.1b resume cómo la información que reside en el DNA se utiliza *dentro* de la célula. Las instrucciones almacenadas en el DNA se utilizan en un proceso de dos etapas denominadas transcripción y traducción. Durante la transcripción, el RNA se sintetiza en una reacción enzimática que copia información a partir del DNA. Durante la traducción, la secuencia de bases de las moléculas de RNA mensajero resultante se utiliza para determinar la secuencia de aminoácidos de las proteínas. Además, la información que inicialmente se almacenaba en secuencias de bases de DNA se utiliza finalmente para codificar la síntesis de moléculas de proteína específicas. Son las proteínas particulares sintetizadas por una célula las que finalmente determinan la mayoría de las características estructurales de ésta, así como las funciones que realiza. La transcripción y la traducción, que juntas constituyen la expresión de la información genética, son los temas de los Capítulos 21 a 23.



(a) Flujo de información genética entre generaciones celulares

(b) Flujo de información genética en el interior de una célula: expresión de la información genética

Figura 18.1 El flujo de información en las células. El diagrama caracteriza las células eucariotas, aunque la replicación del DNA, la división celular, la transcripción y la traducción son procesos que también suceden en las células procariotas. (**a**) La información genética codificada en las moléculas de DNA se transmite a las sucesivas generaciones celulares por la replicación del DNA y por la división celular (en las células eucariotas por medio de la mitosis). El DNA primero se duplica y después se divide equitativamente entre las dos células hijas. De esta forma se asegura que cada célula hija tenga la misma información genética que la célula de la que procede. (**b**) En cada célula, la información genética codificada en el DNA se expresa mediante el proceso de la transcripción (síntesis de RNA) y la traducción (síntesis de proteína). La transcripción implica el uso de segmentos específicos del DNA como moldes para la síntesis de RNA mensajero y otras moléculas de RNA. La traducción es el proceso por el cual los aminoácidos se ensamblan en una secuencia dictada por la secuencia de nucleótidos del RNA mensajero.

Abrimos este capítulo describiendo el descubrimiento del DNA, la molécula cuyo papel informativo, subyace en el centro de este grupo de seis capítulos.

Naturaleza química del material genético

Cuando Mendel postuló por primera vez la existencia de los genes, no conocía la identidad de la molécula que les permitía almacenar y transmitir la información heredada. Pero unos años más tarde, esta molécula fue descubierta, sin querer, por Johann Friedrich Miescher, un médico suizo. En 1869, cuando Miescher estudiaba células en división, informó sobre el descubrimiento de una sustancia que ahora conocemos como DNA, justo unos años antes de que el biólogo celular Walter Flemming observase por primera vez los cromosomas al microscopio.

El descubrimiento del DNA por Miescher condujo a propuestas contradictorias sobre la naturaleza química de los genes

Miescher estaba interesado en estudiar la química del núcleo, ya que la mayoría de los científicos suponía que era donde se situaba el material genético celular. En sus experimentos iniciales, Miescher aisló núcleos de glóbulos blancos de la sangre obtenidos a partir de pus procedente de vendas quirúrgicas. Una vez extraídos los núcleos con álcali, descubrió una sustancia inusual, a la que denominó «nucleína» y de la que ahora sabemos que es, en gran medida, DNA. Miescher continuó estudiando el DNA a partir de una fuente más agradable, el esperma de salmón. El esperma de pescado puede parecer una fuente de material poco usual, hasta que caigamos en la cuenta de que el núcleo supone más del 90% de la masa de una célula espermática típica y de que, además, el DNA supone la mayoría de la masa de las células espermáticas. Por esta razón, Miescher inicialmente creyó, que el DNA estaba implicado en la transmisión de la información hereditaria. Sin embargo, pronto rechazó esta idea, debido a que sus técnicas primitivas de medida sugirieron de forma incorrecta que los óvulos contenían mucho más DNA que los espermatozoides. Dedujo que el espermatozoide y el óvulo debían contribuir aproximadamente con cantidades iguales a la información hereditaria que se transmite a la descendencia, y por esto, le pareció que el DNA no podría transmitir la información hereditaria. Aunque Miescher se equivocó con respecto al papel del DNA, a principios de 1880 un botánico llamado Eduard Zacharias informó de que la extracción del DNA de las células causaba la desaparición de la tinción de los cromosomas. Puesto que las evidencias empezaban a sugerir el papel de los cromosomas en la transmisión de la información hereditaria, Zacharias y otros investigadores infirieron que el DNA era el material genético. Esta visión prevaleció hasta principios de 1900, cuando unos experimentos de tinción interpretados incorrectamente condujeron a la conclusión falsa de que la cantidad de DNA cambiaba dramáticamente en el interior celular. Puesto que se esperaba que las células mantuvieran una cantidad constante de la sustancia que guarda sus instrucciones hereditarias, estas observaciones erróneas condujeron a rechazar la idea de que el DNA transmitía la información genética.

El resultado es que entre 1910 y 1940, la mayoría de los científicos pensaban que los genes estaban formados por proteínas, más que por DNA. Los bloques químicos que construyen tanto las proteínas como los ácidos nucleicos se identificaron a principios de la década de 1900, percibiéndose a las proteínas como estructuras más complejas y por tanto más probables para almacenar la información genética. Se defendía que las proteínas estaban construidas por 20 aminoácidos diferentes que se podían ensamblar en un enorme número de combinaciones, generando, de ese modo, la diversidad de la secuencia y la complejidad esperada en una molécula que almacena y transmite la información genética. Por el contrario, el DNA se percibía de forma general como un polímero que consistía en la misma secuencia de cuatro bases (es decir, el tetranucleótido —ATCG—) repetido una y otra vez, faltándole además, la variabilidad esperada en una molécula genética. De este simple polímero se esperaba que sirviera meramente como un soporte estructural para los genes, que estaban, en cambio, formados por proteínas. Esta visión prevaleció hasta que dos líneas de evidencia resolvieron el asunto a favor del DNA como material genético, como describiremos a continuación.

Avery demostró que el DNA es el material genético de las bacterias

Una gran sorpresa esperaba a los biólogos que estaban estudiando las moléculas proteicas para determinar cómo la información genética se almacena y se transmite. Los antecedentes los proporcionó en 1928 el médico británico Frederick Griffith, que estaba estudiando una cepa patógena de una bacteria, llamada «neumococo» que causa una neumonía fatal en animales. Griffith descubrió que esta bacteria (llamada *Streptococus pneumoniae*) existe en dos formas denominadas *cepa S* y *cepa R*. Cuando crece en un medio de agar sólido, la cepa S produce colonias lisas y brillantes debido al moco, cubierta polisacárida que secreta cada célula, mientras que la cepa R carece de la capacidad para fabricar la cubierta mucosa y por tanto produce colonias que muestran un límite rugoso.

Cuando se inyecta en ratones, la cepa S bacteriana (pero no la cepa R) desencadena una neumonía fatal. La capacidad para causar la enfermedad está directamente relacionada con la presencia del polisacárido en la cubierta de la cepa S, que protege a la bacteria del ataque del sistema inmune del ratón. Uno de los descubrimientos más intrigantes de Griffith fue el que la neumonía también se podía inducir inyectando a los animales una mezcla de bacterias vivas de la cepa R con bacterias muertas de la cepa S (Figura 18.2). Este descubrimiento fue sorprendente porque ni los organismos vivos de la cepa R ni los organismos muertos de la cepa S causaban neumonía si se inyectaban solos. Cuando Griffith realizó la autopsia de los animales a los que había inyectado la mezcla de cepa R viva con cepa S muerta estaban repletos de bacterias vivas de la cepa S. Puesto que a los animales no se les había inyectado ninguna bacteria viva de la cepa S, concluyó que las bacterias de la cepa R no

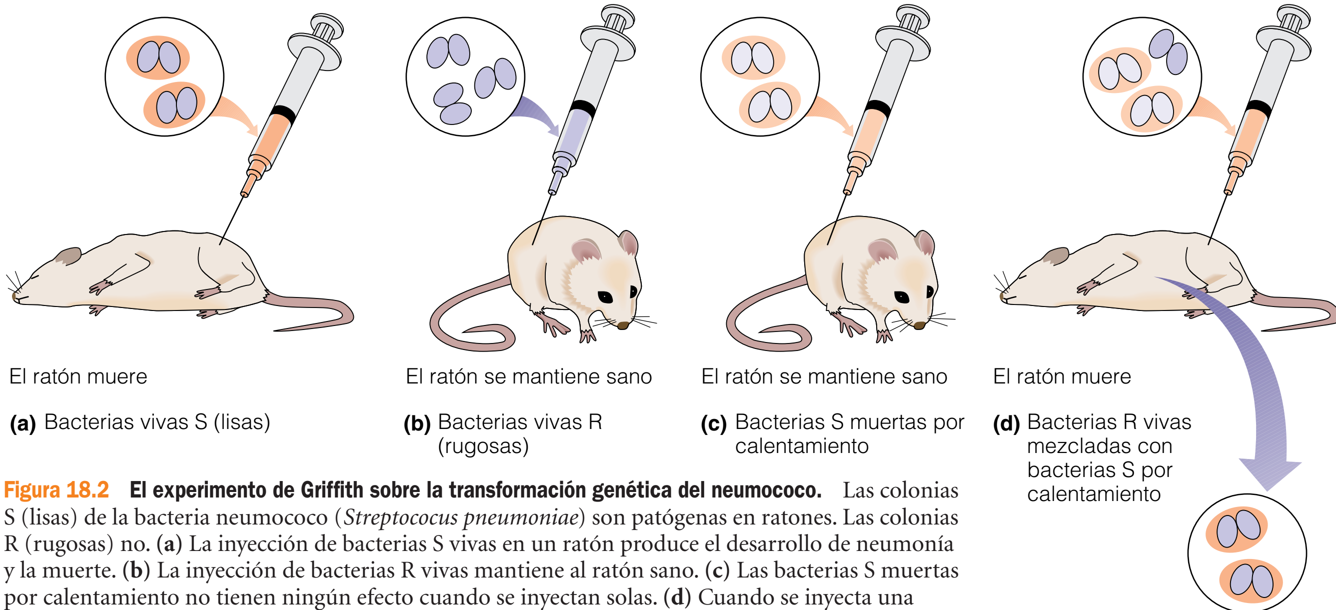


Figura 18.2 El experimento de Griffith sobre la transformación genética del neumococo. Las colonias S (lisas) de la bacteria neumococo (*Streptococus pneumoniae*) son patógenas en ratones. Las colonias R (rugosas) no. (**a**) La inyección de bacterias S vivas en un ratón produce el desarrollo de neumonía y la muerte. (**b**) La inyección de bacterias R vivas mantiene al ratón sano. (**c**) Las bacterias S muertas por calentamiento no tienen ningún efecto cuando se inyectan solas. (**d**) Cuando se inyecta una mezcla de bacterias de la cepa R vivas y bacterias de la cepa S muertas por calentamiento, el resultado es neumonía y muerte. (**e**) El descubrimiento de que la cepa S de bacterias patógenas vivas se recobraba a partir de la sangre del ratón del apartado **d**, le sugirió a Griffith que algún factor químico procedente de las células S muertas por calentamiento, era capaz de causar un cambio heredable (transformación) de las bacterias R no patógenas en bacterias S patógenas. El factor químico se identificó posteriormente como el DNA.

patógenas, se habían convertido de alguna forma en bacterias de la cepa S, patógenas, debido probablemente, a alguna sustancia presente en las bacterias de la cepa S (muertas por calentamiento) con las que se habían inyectado las de la cepa R. Él denominó a este fenómeno **transformación genética** y se refirió a la sustancia activa (aunque todavía desconocida) de las bacterias de la cepa S como «el principio transformante».

Los descubrimientos de Griffith dispusieron el escenario de 14 años de trabajo de Oswald Avery y de sus colegas en el Instituto Rockefeller de Nueva York. Estos investigadores continuaron con los trabajos sobre la transformación bacteriana hasta su conclusión más lógica, preguntándose qué componente de la cepa S muerta por calentamiento era el responsable de la actividad transformante. Fraccionaron extractos de la cepa S bacteriana exentos de células y descubrieron que sólo la fracción de los ácidos nucleicos era capaz de causar la transformación. Además, la actividad se eliminaba de manera específica por tratamiento con desoxirribonucleasa, una enzima que degrada el DNA. Ésta y otras evidencias les convencieron de que la sustancia transformante del neumococo era el DNA, una conclusión publicada por Avery, Colin MacLeod y Maclyn McCarty en 1944.

Ésta es la primera afirmación rigurosamente documentada, al respecto de que el DNA pudiera portar información genética. Pero, a pesar del rigor de los experimentos, la asignación del papel genético al DNA no obtuvo una aceptación inmediata. El escepticismo se debía en parte a la convicción persistente y extendida ampliamente de que al DNA le faltaba la complejidad necesaria como para desempeñar tal papel. Además, muchos científicos se cuestionaban si la información genética en las bacterias estaría relacionada con la herencia en otros organismos. Sin embargo, la mayoría de las dudas que quedaban se acallaron ocho años después cuando se demostró que el DNA era también el material genético de un virus, el bacteriófago T2.

Hershey y Chase demostraron que el DNA es el material genético de los virus

Los **bacteriófagos**, o **fagos** para abreviar, son virus que infectan a bacterias. Han sido objeto de estudio científico desde 1930 y muchos de nuestros primeros conocimientos de genética molecular proceden de experimentos que implican a estos virus. El Anexo 18A describe la anatomía y el ciclo de replicación de algunos fagos y destaca sus ventajas para estudios genéticos.

Uno de los fagos, que infectan a la bacteria *Escherichia coli*, estudiados más a fondo es el bacteriófago T12. Durante la infección, este virus se une a la superficie de la célula bacteriana, y le inyecta su material. Poco después, la célula bacteriana empieza a producir miles de nuevas copias del virus. Este escenario sugiere que el material inyectado en la célula bacteriana porta la información genética que guía la producción de virus. ¿Cuál es la naturaleza química del material inyectado? En 1952, Alfred Hershey y Martha Chase diseñaron un experimento para dirimir esta cuestión. Sólo existen dos posibilidades ya que el virus T2 está formado solamente por dos clases de moléculas: DNA y proteínas. Para distinguir entre estas dos alternativas, Hershey y Chase se aprovecharon del hecho de que las proteínas del virus T2, como la mayoría de las proteínas, contienen azufre (en los aminoácidos metionina y cisteína) pero no fósforo, mientras que el DNA viral contiene fósforo (en su esqueleto azúcar fosfato) pero no azufre. Hershey y Chase prepararon además dos lotes de partículas del fago T2 (a los que se denominan fagos intactos) con distintos tipos de marcaje radioactivo. En uno de los lotes se marcaron las proteínas del fago con ^{35}S; en el otro lote el DNA del fago se marcaba con el isótopo ^{32}P.

Usando de esta forma los isótopos radiactivos, Hershey y Chase localizaron el destino tanto de las proteínas como del DNA, durante el proceso de infección (Figura 18.3a). Empezaron el experimento mezclando el fago radiactivo con células bacterianas intactas, permitiendo así que las partículas del fago se adhiriesen a la superficie de las células bacterianas e inyectasen su material genético a las células. En este punto Hersey y Chase descubrieron que las cubiertas proteicas vacías (o «fantasmas» de fagos) se podían retirar de forma efectiva de la superficie de las bacterias, agitando la suspensión con una batidora convencional y recuperando las células bacterianas por centrifugación. Midieron, entonces, la radiactividad en el líquido sobrenadante y en el precipitado de bacterias del fondo del tubo.

Los datos revelaron que la mayoría del ^{32}P (65%) quedaba en las células bacterianas, mientras que la mayoría del ^{35}S (80%) se liberaba al medio circundante (Figura 18.3b). Puesto que el ^{32}P marcaba el DNA viral y el ^{35}S marcaba las proteínas virales, Hersey y Chase concluyeron que era el DNA del fago T2, y no las proteínas, lo que había sido inyectado a las células bacterianas, y por tanto, debería funcionar como material genético. Estas conclusiones fueron respaldadas por la siguiente observación: cuando las bacterias radiactivas infectadas se resuspendían en un medio líquido fresco y se incubaban durante más tiempo, el ^{32}P se transfería a alguna de las partículas de los fagos de la descendencia, pero el ^{35}S, no.

Como resultado de los experimentos que hemos descrito, a principios de la década de 1950, la mayoría de los biólogos aceptaban la idea de que los genes estaban formados por DNA, pero no por proteína. Desafortunadamente, el visionario Oswald Avery, máximo responsable de dar un giro a la visión existente sobre la función de DNA, nunca recibió su bien merecido reconocimiento. El Comité del Premio Nobel debatió sobre el trabajo de Avery, pero decidió que no había hecho suficiente. Quizás la naturaleza modesta y sin pretensiones de Avery fue la causante de esta falta de reconocimiento. Después de la muerte de Avery en 1955, el bioquímico Erwin Chargaff escribió en su tributo: «Era un

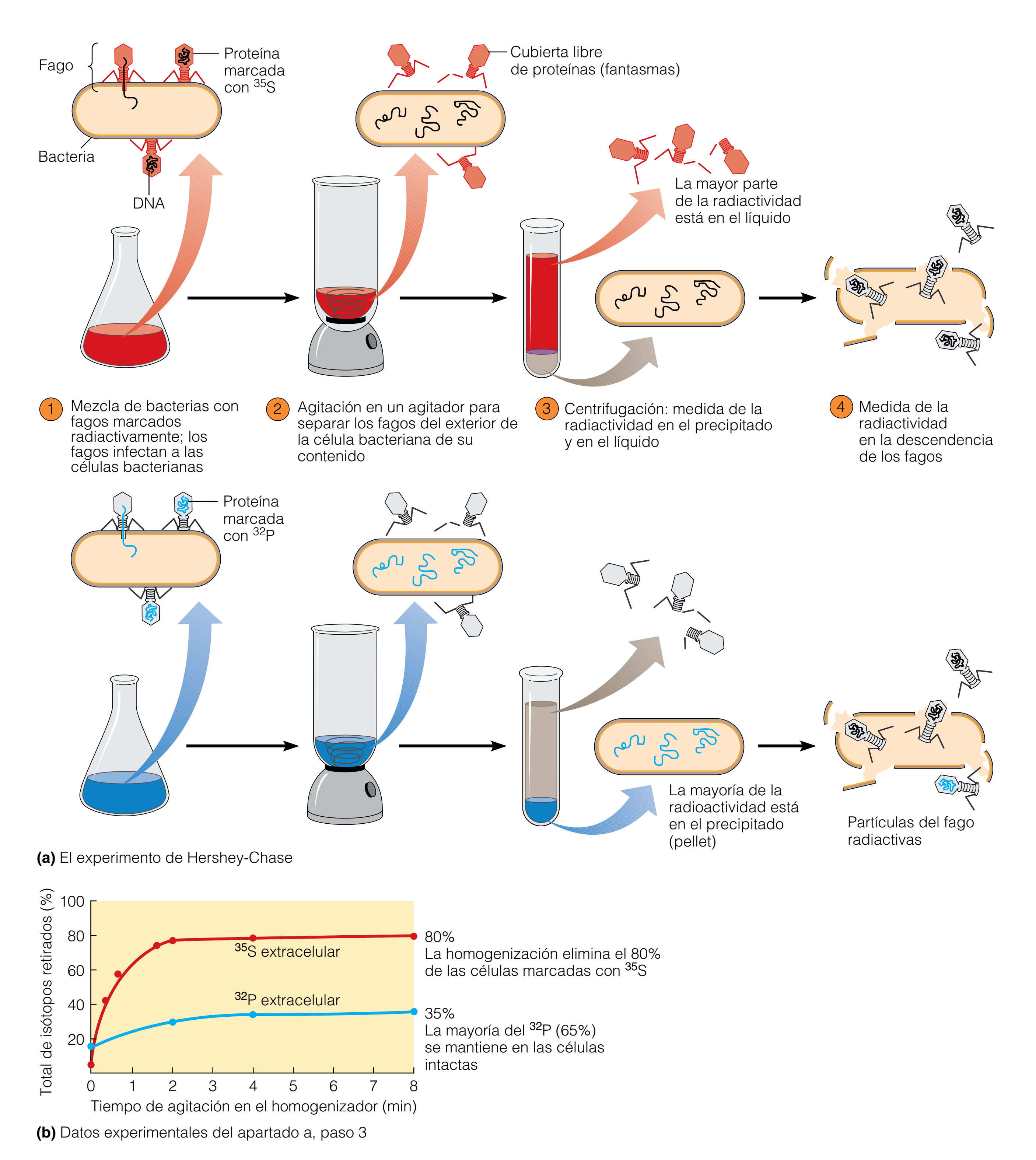


Figura 18.3 Experimento de Hershey-Chase: el DNA como material genético del fago T2. **(a)** ① Se utilizan fagos T2 marcados bien con ^{35}S (para marcar proteínas) bien con ^{32}P (para marcar DNA) para infectar bacterias. Los fagos se adsorben a la superficie celular e inyectan su DNA. ② La agitación de las células infectadas en un agitador elimina la mayoría de ^{35}S de las células, mientras que la mayoría de ^{32}P se mantiene. ③ La centrifugación hace que las células formen un precipitado; cualquier partícula libre del fago, incluyendo los fantasmas que quedan en el líquido sobrenadante. ④ Cuando las células de todos los precipitados se incuban, el DNA del fago dirige en ellas la síntesis y finalmente la liberación de nuevas partículas del fago. Algunos de estos fagos contienen ^{32}P en su DNA (ya que el antiguo DNA marcado del fago, se ha empaquetado en alguna de las nuevas partículas), pero ninguna contiene ^{35}S en las proteínas de su cubierta. **(b)** El gráfico muestra el grado en que se retiran tanto el ^{35}S como el ^{32}P de las células intactas en el paso 3, en función del tiempo de agitación. Unos pocos minutos de agitación son suficientes como para retirar la mayoría (80%) del ^{35}S, mientras que en ese mismo tiempo se mantiene la mayoría (65%) del ^{32}P de las células.

Fagos: sistema modelo para estudiar genes

Desde su inicio a mediados del siglo XIX, la genética empleó una amplia variedad de organismos como material de experimentación. Inicialmente, centró su atención sobre animales y plantas, como los guisantes de Mendel y las moscas de la fruta popularizadas por investigadores posteriores. Sin embargo, alrededor de 1940, comenzaron a probarse bacterias y virus, proporcionando a los biólogos sistemas experimentales que revolucionaron literalmente la ciencia de la genética llevándola al nivel molecular.

Los bacteriófagos han sido especialmente importantes. Los bacteriófagos o fagos para acortar, son virus que infectan a células bacterianas. Es fácil obtener grandes cantidades de partículas de fagos en un corto periodo de tiempo, lo que facilita enormemente el muestreo de mutantes —fagos con variaciones heredables— que de esta forma hacen posible que los genetistas identifiquen genes en particular. Algunos de los fagos estudiados en mayor profundidad son el bacteriófago T2, el T4 y el T6 (los denominados T-pares) que infectan a la bacteria *E. coli*. Los tres fagos T-pares tienen estructuras similares, que son bastante elaboradas. El fago T4 se muestra en la Figura 18A.1. La *cabeza* del fago es una cápsula proteica que tiene forma de icosaedro hueco (un objeto de 20 caras) relleno de DNA. La cabeza se une a una *cola* proteica, que consiste en un *núcleo de la cola* hueco rodeado por una *vaina* contráctil *de la cola* y que termina en una *placa basal* hexagonal a la que se unen seis *fibras de la cola*.

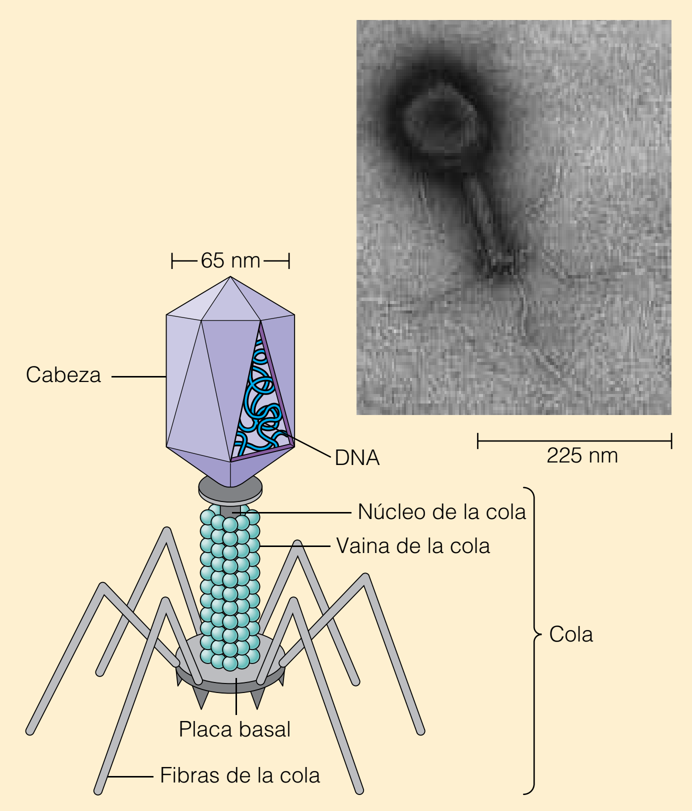
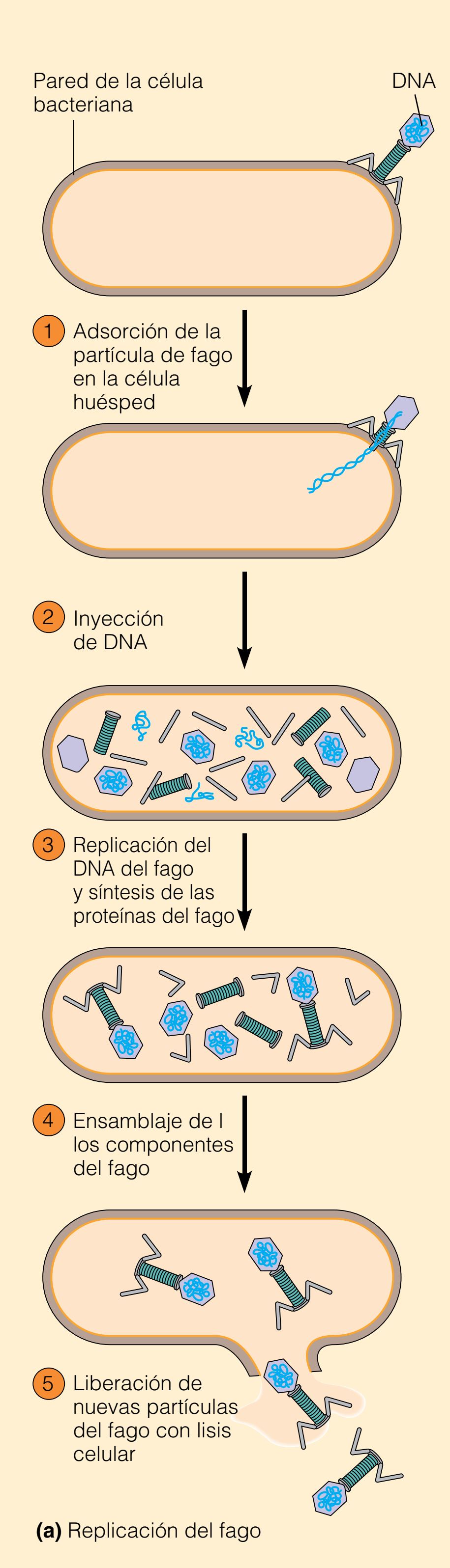


Figura 18A.1 Estructura del fago T4. La imagen identifica los componentes estructurales principales de este fago, no todos son visibles en la micrografía (MET).

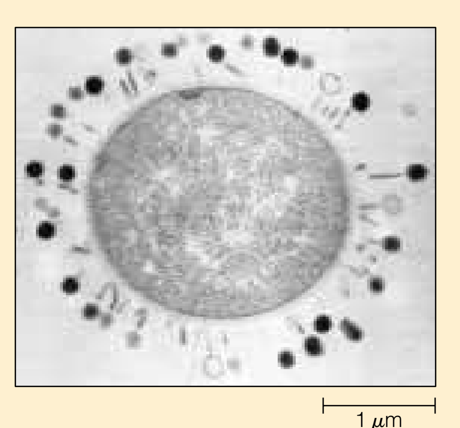
La Figura 18A.2 representa los principales acontecimientos en el ciclo de replicación del fago T4. Los esquemas no son a escala; la bacteria es proporcionalmente más grande, como indica la micrografía electrónica. El proceso empieza con la adsorción de una partícula de fago a la pared de una célula bacteriana. Cuando el fago colisiona con la célula, se aplasta de modo que su placa basal se ancla a un receptor proteico específico de la pared (Figura 18A.2a, ①). Lo siguiente es que la vaina de la cola, se contrae dirigiendo a la cola central hueca a través de la pared bacteriana. La porción central de la cola forma una aguja a través de la que el DNA del bacteriófago se inyecta en la bacteria (②). Una vez que este DNA ha alcanzado la célula bacteriana, la información genética del fago se transcribe y se traduce (③). Esto da lugar a unas pocas proteínas clave que alteran la maquinaria metabólica de la célula huésped en beneficio del fago, que consiste normalmente en su rápida multiplicación. Puesto que el fago consiste simplemente en una molécula de DNA rodeado por una cubierta proteica (su *cápsida*), la mayoría de la actividad metabólica de la célula infectada está canalizada hacia la replicación del DNA del fago y hacia la síntesis de las proteínas de la cápsida. El DNA del fago y las proteínas de la cápsida se autoensamblan en cientos de nuevas partículas del fago (④). En aproximadamente media hora, la célula infectada se lisa (se abren grietas), liberando al medio las nuevas partículas del fago. (⑤). Ahora cada nuevo fago infecta otra célula bacteriana, haciendo posible la obtención de enormes poblaciones del fago —tantas como 10^{11} partículas del fago por mililitro de cultivo de bacterias infectadas—.

Para determinar el número de partículas de fago en una muestra, un volumen medido se mezcla con bacterias creciendo en medio líquido para permitir la adsorción de los fagos a la bacteria. La mezcla se extiende en un medio nutritivo sólido (que contiene agar) en una placa de Petri. En la incubación, la bacteria se multiplica para producir un «césped» de células sobre la superficie del medio nutritivo. Así, en cualquier lugar que una partícula vírica haya infectado una célula bacteriana, una mancha clara aparecerá en el césped debido a que las células bacterianas han muerto por la población del fago en multiplicación. Estas manchas claras se denominan placas. El número de placas que aparecen en el césped bacteriano representan el número de partículas de fago en la mezcla original de bacterias-fagos, siempre que el número inicial de fagos sea lo suficientemente pequeño como para asegurar que cada uno va a dar lugar a una placa separada. La Figura 18A.3 muestra las placas formadas por el bacteriófago T4 en el césped de células de *E. coli*.

El curso de los acontecimientos mostrados en la Figura 18A.2a se denomina *crecimiento lítico* y es característico de un *fago virulento*. El crecimiento lítico tiene como resultado la lisis de la célula huésped y la producción de una progenie de muchas partículas de fago. En comparación, un *fago temperado* puede o



(a) Replicación del fago



(b) Bacteria con partículas de fago unidas

Figura 18A.2 El ciclo lítico de vida de un fago T-par. (**a**) El ciclo de replicación de un fago T-par, empieza cuando una partícula del fago ① se adsorbe en la superficie de una célula bacteriana e ② inyecta su DNA en la célula. ③ El DNA del fago se replica en la célula huésped y codifica la producción de las proteínas del fago. ④ Estos componentes se ensamblan en nuevas partículas de fago. ⑤ Normalmente, la célula huésped se lisa, liberando las partículas de fago de la descendencia que pueden infectar a más bacterias. Este proceso de replicación es típico del crecimiento lítico de muchos fagos. (**b**) Micrografía electrónica de una bacteria con partículas de fago pegadas a su superficie (MET).

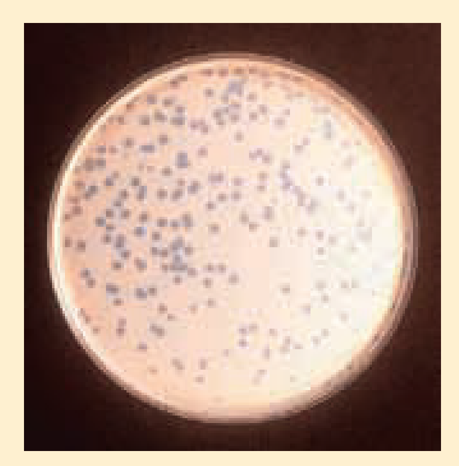


Figura 18A.3 Placas de fago en un césped de bacterias. Se han formado placas de fago sobre un césped de *E. coli* infectadas con el fago T4. Cada placa procede de la reproducción de una única partícula de fago de la mezcla original.

bien producir crecimiento lítico, como hace un fago virulento, o integrar su DNA en el cromosoma bacteriano sin causar ningún daño inmediato a la célula huésped. Un ejemplo de fago temperado especialmente bien estudiado, es el bacteriófago λ (lambda), que junto con los fagos T-pares, infecta a las células de *E. coli*. En el estado integrado o *estado lisogénico*, el DNA de un fago temperado se denomina *profago*. El profago se replica junto con el DNA bacteriano, a menudo a través de muchas generaciones de células huésped (Figura 18A.4). Durante este tiempo, los genes del fago, aunque potencialmente letales, para el huésped, están inactivos o *reprimidos*. Sin embargo, bajo ciertas condiciones, el DNA del profago se escinde del cromosoma bacteriano y entra otra vez en el ciclo lítico, produciendo progenie de partículas de fago y lisando la célula huésped.

Una razón por la que los fagos son tan atractivos para los genetistas es porque el pequeño tamaño de sus genomas (que puede ser de DNA o de RNA) hace relativamente fácil de identificar y estudiar sus genes. El genoma del bacteriófago λ, es una molécula de DNA sencilla que contiene menos de 60 genes, comparado con los varios miles de genes de una bacteria como *E. coli.* Otros fagos son todavía más pequeños; en algunos casos, contienen menos de una docena de genes. Debido a sus genomas sencillos, su rápida multiplicación y el enorme número de progenie que se puede producir en un pequeño volumen de medio de cultivo, los bacteriófagos están entre los «organismos» mejor conocidos. Además, también tienen otros beneficios prácticos. Puesto que los fagos son capaces de destruir bacterias, algunas empresas de biotecnología están investigando en el desarrollo de fagos modificados que podrían ser útiles para tratar infecciones bacterianas en humanos, especialmente en aquellos casos en los que las bacterias se han hecho resistentes a los antibióticos.

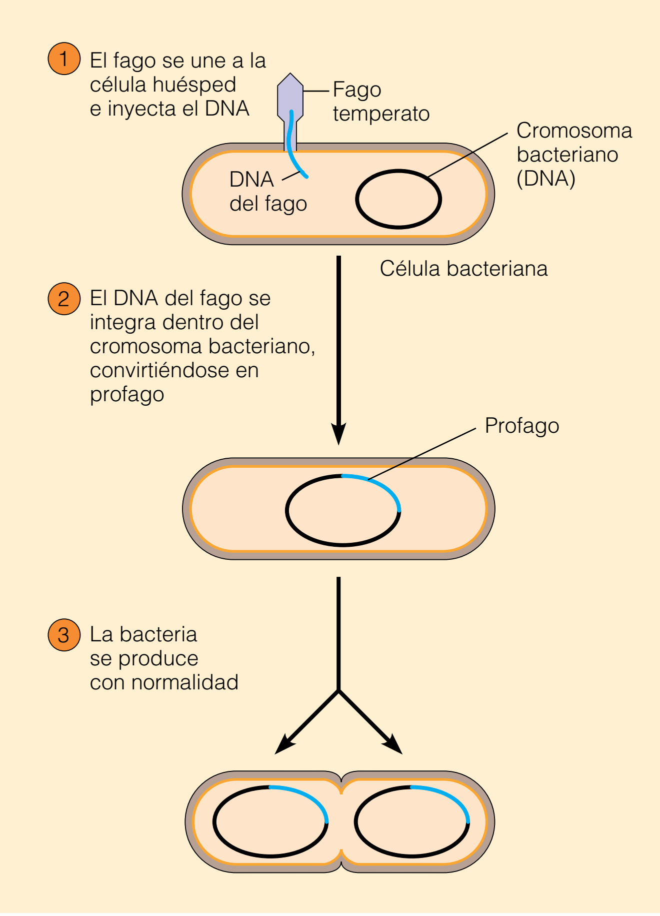


Figura 18A.4 Estado lisogénico de un profago dentro de un cromosoma bacteriano. El DNA inyectado por un fago temperado se puede integrar en el DNA de un cromosoma bacteriano. El DNA del fago integrado, denominado profago, se replica junto con el DNA bacteriano cada vez que la bacteria se reproduce.

hombre tranquilo; habría honrado más al mundo, si el mundo le hubiera honrado más a él».

¿Por qué los trabajos de Hershey-Chase recibieron una acogida más cálida que los trabajos previos de Avery sobre la transformación de las bacterias, aunque los dos condujeron a las mismas conclusiones? La principal razón parece haber sido simplemente el paso del tiempo y el cúmulo de evidencias circunstanciales adicionales después de la publicación de Avery de 1944. Quizás la evidencia más importante fue que el DNA tiene una estructura lo suficientemente variable como para ser el material genético. Esta evidencia procedía de estudios sobre la composición de bases del DNA, como veremos después.

Las reglas de Chargaff revelan que A = T y que C = G

A pesar de la reacción de indiferencia con la que inicialmente se recibió el trabajo de Avery, éste ejerció una influencia trascendental en otros científicos. Entre ellos estaba Erwin Chargaff, que estaba interesado en la composición de bases del DNA. Entre 1944 y 1952, Chargaff utilizaba métodos cromatográficos para separar y cuantificar las cantidades relativas de las cuatro bases en el DNA —adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T)—. De estos análisis surgieron varios descubrimientos importantes. Primero demostró que el DNA aislado a partir de diferentes tipos celulares de especies dadas, tenían el mismo porcentaje de cada una de las cuatro bases (Tabla 18.1), y que este porcentaje no varía con el individuo, el tejido, la edad y el estado nutricional o el medioambiente. Esto es exactamente lo que podría esperarse de la sustancia química que almacena información genética, ya que de las células de una especie dada se espera que tengan una información genética similar. Sin embargo, Chargaff descubrió que la composición de bases del DNA, varía entre especies. Esto se observa, examinando la última columna de la Tabla 18.1, que muestra las cantidades relativas de las bases A y T con respecto a las cantidades relativas de G y C en los DNAs de varios organismos. La comparación de estos datos le reveló a Chargaff que las preparaciones de DNA de especies relacionadas estrechamente tienen una composición de bases similar, mientras que aquéllas de especies diferentes tienden

Tabla 18.1 Composición de bases del DNA de varios orígenes

Origen del DNA	Número de cada tipo de nucleótido*				Proporción de nucleótidos**		
	A	T	G	C	A/T	G/C	(A + T)/(G + C)
Timo bovino	28,4	28,4	21,1	22,1	1,00	0,95	1,31
Hígado bovino	28,1	28,4	22,5	21,0	0,99	1,07	1,30
Riñón bovino	28,3	28,2	22,6	20,9	1,00	1,08	1,30
Cerebro bovino	28,0	28,1	22,3	21,6	1,00	1,03	1,28
Hígado humano	30,3	30,3	19,5	19,9	1,00	0,98	1,53
Langosta	29,3	29,3	20,5	20,7	1,00	1,00	1,41
Erizo de mar	32,8	32,1	17,7	17,3	1,02	1,02	1,85
Germen de trigo	27,3	27,1	22,7	22,8	1,01	1,00	1,19
Cangrejo marino	47,3	47,3	2,7	2,7	1,00	1,00	7,50
Aspergillus (moho)	25,0	24,9	25,1	25,0	1,00	1,00	1,00
Saccharomyces cerevisiae (levadura)	31,3	32,9	18,7	17,1	0,95	1,09	1,79
Clostridium (bacteria)	36,9	36,3	14,0	12,8	1,02	1,09	2,73

* Los valores de estas cuatro columnas son el número aproximado de cada tipo de nucleótido encontrado por cada 100 nucleótidos de DNA.
** Las proporciones de A/T y de G/C no son todas exactamente 1,00 debido al error experimental.

a exhibir composiciones de bases bastante distintas. Una vez más, esto es lo que se esperaría de una molécula que almacena información genética.

Sin embargo, la observación más sorprendente de Chargaff fue su descubrimiento de que para todas las muestras de DNA examinadas, el número de adeninas era igual al número de timinas (A = T), y el número de guaninas igual al número de citosinas (G = C): esto significaba que el número de purinas era igual al número de pirimidinas (A + G = C + T). El significado de estas equivalencias, conocidas como las **reglas de Chargaff**, era un enigma y así se mantuvo hasta que en 1953 Watson y Crick establecieron el modelo de la doble hélice de DNA.

La estructura del DNA

A medida que la comunidad científica aceptaba gradualmente las conclusiones de que el DNA almacenaba la información genética, comienza a surgir un nuevo grupo de preguntas relacionadas con la manera en la que el DNA realiza su función genética. Uno de los primeros temas que surge es la cuestión sobre cómo se replica el DNA de una forma tan precisa que las copias duplicadas de la información genética se pueden pasar de una célula a otra durante la división celular, y de los padres a la descendencia. Contestar a esta pregunta requiere el conocimiento de la estructura tridimensional del DNA, que fue proporcionada en 1953 cuando Watson y Crick formularon su modelo de la doble hélice del DNA. Hemos descrito la estructura de la doble hélice en el Capítulo 3 y su descubrimiento en el Anexo 3A, pero volvemos a ello ahora, para revisarlo y ver algunos detalles en profundidad.

Watson y Crick descubrieron que el DNA es una doble hélice

En 1952, James Watson y Francis Crick formaban parte del pequeño grupo de científicos que estaban convencidos de que el DNA era el material genético y de que el conocimiento de su estructura tridimensional les proporcionaría pistas valiosas sobre cómo funcionaba. Trabajando en la Universidad de Cambridge, en Inglaterra, se aproximaron al rompecabezas construyendo modelos en alambre de estructuras posibles. Durante años, se pensaba que el DNA era un polímero largo con un esqueleto de azúcares repetidos (desoxiribosas) y unidades de fosfato y una base nitrogenada unida a cada azúcar. Para construir su modelo Watson y Crick se basaron en que a pH fisiológico las bases A, G, C y T existen en unas formas particulares que permiten la formación de puentes de hidrógeno específicos entre parejas. Sin embargo, la evidencia experimental más importante, vino del patrón de difracción de rayos X del DNA obtenido por Rosalind Franklin, que estaba trabajando en el King's College de Londres. La imagen de Franklin indicaba que el DNA era una estructura helicoidal, y basándose en la información proporcionada por esta imagen, Watson y Crick propusieron finalmente un modelo de DNA que consistía en dos hebras entrelazadas, una **doble hélice**.

En la doble hélice de Watson y Crick, ilustrada en la Figura 18.4, los esqueletos de azúcar fosfato de las dos hebras están en el exterior de la hélice, y las bases miran hacia el interior, hacia el centro de la hélice, formando los escalones de una escalera circular a la que se parece la estructura. La hélice es dextrógira, esto significa que la hélice se curva «hacia arriba» y hacia la derecha (fíjese en que esto es cierto, incluso si se pone el diagrama al revés). Contiene diez pares de nucleótidos por vuelta y avanza 0,34 nm por cada par de nucleótidos. Consecuentemente cada vuelta completa de la

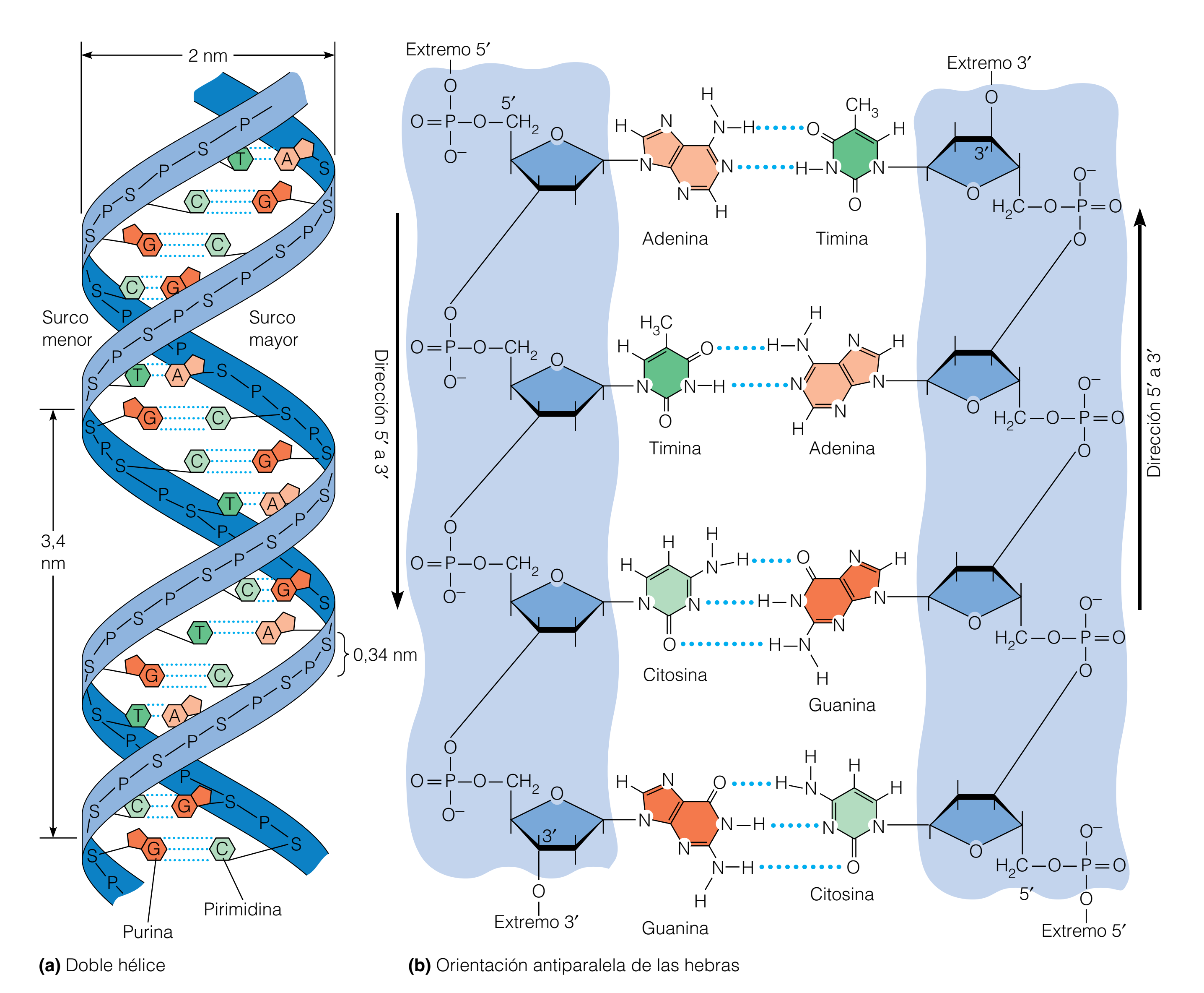


Figura 18.4 **La doble hélice de DNA.** (**a**) Esta imagen esquemática muestra las cadenas de azúcar fosfato del esqueleto de DNA, los pares de bases complementarias, el surco mayor y menor y otras dimensiones importantes. A = Adenina, G = Guanina, T = Timina, P = Fosfato y S = Azúcar (deoxiribosa). (**b**) Una de las hebras de la molécula de DNA está orientada en dirección 5′ ⟶ 3′ mientras que su hebra complementaria está orientada en la dirección opuesta 5′ ⟶ 3′. Este diagrama también muestra los puentes de hidrógeno que conectan los pares de bases AT y GC.

hélice añade 3,4 nm a la longitud de la molécula. El diámetro de la hélice es de 2 nm. Esta distancia es demasiado pequeña para dos purinas y demasiado grande para dos pirimidinas, pero se ajusta bien para una purina y una pirimidina, de acuerdo con las reglas de Chargaff. En otras palabras, se necesita el par purina-pirimidina por consideraciones estéricas. Las dos hebras se sostienen por puentes de hidrógeno entre las bases de hebras opuestas. Además, los puentes de hidrógeno que mantienen juntas las dos hebras de la doble hélice *sólo ajustan cuando se forman entre la base adenina (A) en una de las cadenas y timina (T) en la otra, o entre la base guanina (G) en una cadena y citosina (C) en la otra*. Esto significa que la secuencia de bases en una cadena determina la secuencia de bases de la cadena opuesta; además, se dice que las dos cadenas de la doble hélice de DNA son **complementarias**. Ese modelo explica por qué Chargaff había observado que las moléculas de DNA contienen cantidades iguales de las bases A y T que de las bases G y C.

La implicación más profunda del modelo de Watson y Crick es que sugiere un mecanismo por el que las células replican su información genética: simplemente, las dos hebras de la doble hélice de DNA se separan antes de la división, de manera que cada hebra funciona como un molde que dirige la síntesis de una nueva hebra de DNA, usando las reglas del emparejamiento de bases. En otras palabras, la base A en la hebra molde definiría la inserción de la base T en la

hebra de nueva formación, la base G especifica la inserción de la base C, la base T concreta la inserción de la base A, y la base C implicaría la inserción de la base G. En el siguiente capítulo, trataremos las evidencias experimentales para el mecanismo propuesto y describiremos las bases moleculares de la replicación del DNA en detalle.

En la Figura 18.4 se ilustran varias de las características más importantes de la doble hélice de DNA. Por ejemplo, la forma en la que giran las dos hebras crea un *surco mayor* y un *surco menor*. Estos surcos desempeñan un papel importante en las interacciones del DNA con varias de moléculas. Otra característica importante es la orientación *antiparalela* de las dos hebras de DNA, que se ilustra en la Figura 18.4b. Este diagrama muestra que, a medida que nos desplazamos a lo largo de una de las hebras en una dirección dada, los nucleótidos sucesivos están unidos por enlaces fosfodiéster que unen el carbono 5′ de un nucleótido al carbono 3′ del siguiente nucleótido; de una cadena de este tipo se dice que tiene una orientación $5' \rightarrow 3'$. Pero si se mueve a lo largo de la otra hebra en la misma dirección, el orden de los enlaces exhibe una orientación $3' \rightarrow 5'$. En otras palabras, los enlaces fosfodiéster de las dos hebras se orientan en direcciones opuestas. Las diferentes orientaciones de las dos hebras son una característica que tiene implicaciones importantes tanto para la replicación como para la transcripción del DNA como veremos en los Capítulos 19 y 21.

La hélice dextrógira de Watson y Crick es una versión idealizada de lo que se denomina B-DNA (Figura 18.5a). Pero las dobles hélices de B-DNA que se forman de manera natural son moléculas flexibles que a menudo se desvían de este ideal, con formas y dimensiones exactas que dependen de la secuencia local de nucleótidos. Además, aunque el B-DNA es indudablemente la forma principal del DNA en las células, también pueden existir otras formas, quizás dispuestas en pequeños segmentos intercalados en moléculas mayoritariamente de B-DNA. De estas formas alternativas, las más importantes son A-DNA y Z-DNA. La forma A-DNA tiene una configuración en hélice dextrógira que es más corta y más gruesa que la forma B-DNA. La forma A-DNA se puede crear de manera artificial deshidratando el B-DNA, pero se desconoce que exista en condiciones celulares normales. Como muestra la Figura 18.5b la forma Z del DNA es una doble hélice levógira. Su nombre deriva del patrón en zig-zag que sigue su esqueleto de azúcar fosfato, y es más larga y delgada que la forma B del DNA. La forma Z del DNA surge con mayor facilidad en aquellas regiones del DNA que contienen o bien purinas alternando con pirimidinas o bien citosinas metiladas (situación que se produce en el DNA cromosómico; *véase* Capítulo 23).

Aunque la significación biológica de la forma Z del DNA no se conoce con exactitud, algunas evidencias sugieren que pequeños tramos del DNA pasan de manera transitoria a la configuración Z como parte del proceso mediante el cual se activa la expresión de ciertos genes.

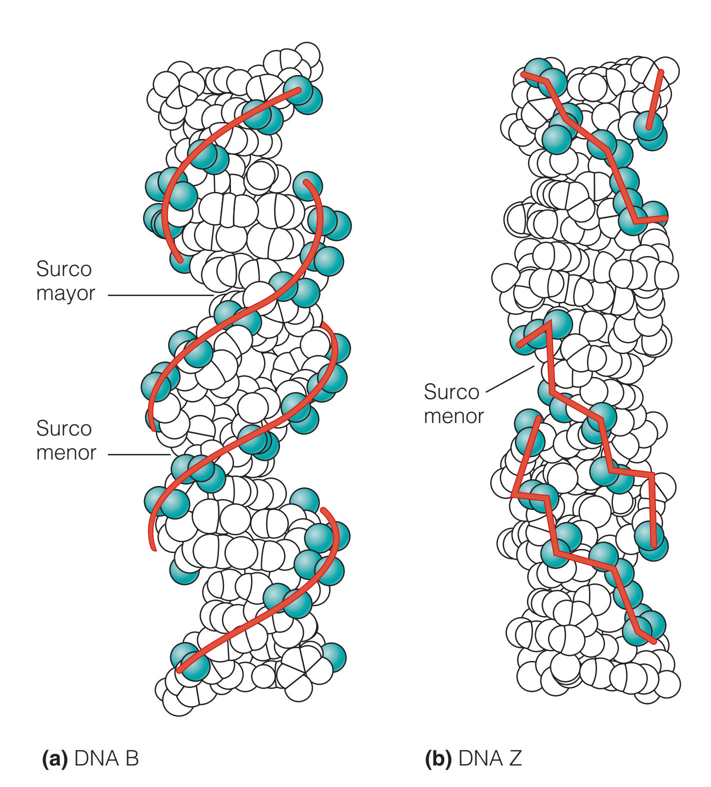


Figura 18.5 Formas alternativas de DNA. (**a**) En la forma B del DNA, el esqueleto de azúcar fosfato forma una doble hélice suavemente dextrógira. (**b**) En el DNA Z, el esqueleto forma una hélice en zigzag, levógira. Se utiliza el color para destacar el esqueleto del DNA.

El DNA puede transformarse en formas relajadas y superenrolladas

En muchas situaciones el DNA de doble hélice puede girar sobre sí mismo para formar **DNA superenrollado**. Aunque ahora se sabe que es una propiedad del DNA extendida ampliamente, el superenrollamiento se identificó por primera vez en el DNA de ciertos virus pequeños que contenían moléculas de DNA circular que se disponen en bucles cerrados. Las moléculas de DNA circular también se han encontrado en bacterias, mitocondrias y cloroplastos. Aunque el superenrollamiento no está restringido al DNA circular, es mucho más fácil de estudiar en estas moléculas.

Una molécula de DNA puede ir hacia atrás o hacia delante entre el estado de superenrollamiento y el estado de no superenrollamiento, o estado *relajado*. Para entender esta idea básica, podría desarrollar el siguiente ejercicio. Empiece con un trozo de cuerda que consista en dos hebras que giren juntas formando una hélice dextrógira; éste es el equivalente a una molécula de DNA lineal relajada. Unir los extremos de la cuerda no cambia nada; la cuerda ahora es circular pero todavía está en el estado relajado. Pero si antes de sellar los extremos, se le da a la cuerda una vuelta extra en la dirección en la cual las hebras están entrelazadas, la cuerda entra en un superenrollamiento *positivo*. En cam-

bio, si antes de sellar los extremos, a la cuerda se le da una vuelta extra en la dirección opuesta, la cuerda entra en un superenrollamiento *negativo*. De manera similar, una molécula de DNA relajada se puede convertir en una molécula de DNA con un superenrollamiento positivo girándola en la misma dirección en la que está enrollada y en una molécula de DNA con un superenrollamiento negativo girándola en la dirección opuesta (Figura 18.6a). Las moléculas de DNA circular que se encuentran en la naturaleza, incluyendo el de bacterias, virus y orgánulos eucariotas están de manera invariable superenrrolladas negativamente. (La Figura 18.6b muestra una molécula de DNA circular de un fago relajada y una molécula similar con superenrollamiento negativo.)

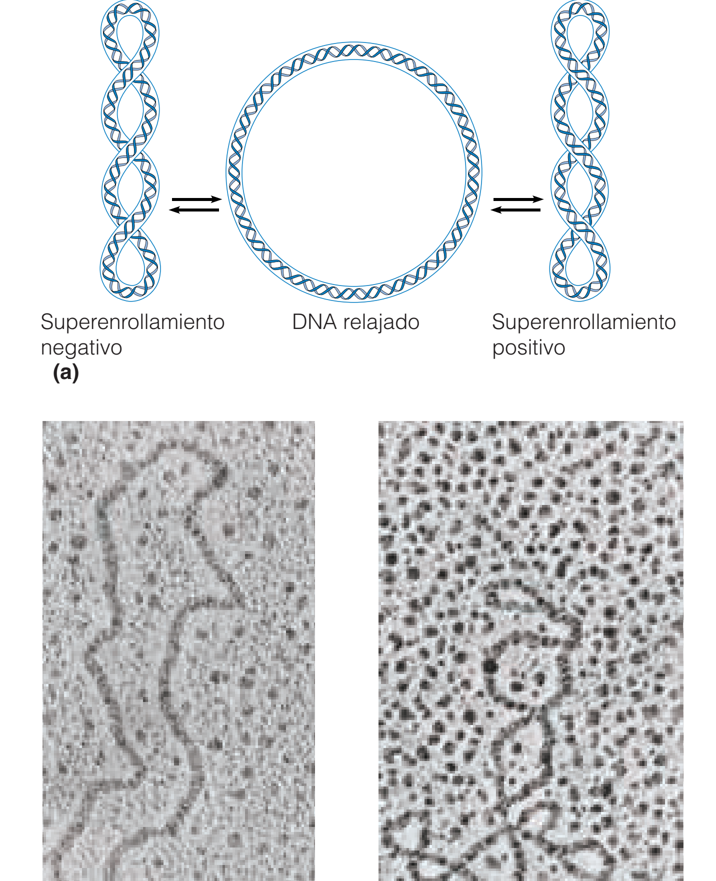


Figura 18.6 Conversión de DNA relajado y superenrollado. (**a**) Diagrama de una molécula de DNA circular relajado y su conversión hacia formas superenrolladas por el giro en la misma dirección en la que la doble hélice está enrollada (superenrollamiento positivo). (**b**) Micrografías electrónicas de moléculas de DNA circular de un bacteriófago denominado PM2, con una molécula relajada a la izquierda, y una molécula con superenrollamiento negativo a la derecha (METs).

El superenrollamiento se produce también en moléculas de DNA lineal, cuando las regiones de la molécula están ancladas a alguna estructura celular de manera que no pueda rotar libremente. En un momento dado, porciones significativas del DNA lineal del núcleo de las células eucariotas pueden estar superenrolladas, y cuando el DNA se empaqueta en los cromosomas en el momento de la división celular, el superenrollamiento masivo ayuda a hacer al DNA más compacto.

El superenrollamiento influye tanto en la organización espacial como en el estado de energía del DNA y afecta a la capacidad de una molécula de DNA para interactuar con otras moléculas. El superenrollamiento positivo implica un enrollamiento muy apretado de la doble hélice y por tanto se reducen las oportunidades para interaccionar. Por el contrario, el superenrollamiento negativo está asociado con el desenrollamiento de la doble hélice, que aumenta el acceso de sus hebras a las proteínas implicadas en la replicación o en la transcripción del DNA.

La interconversión entre la forma relajada y la forma superenrollada del DNA está catalizada por enzimas denominadas **topoisomerasas**, que se clasifican en *tipo I* o en *tipo II*. Ambos tipos catalizan la relajación del DNA superenrollado, pero las enzimas de tipo I lo hacen introduciendo cortes transitorios en una sola hebra del DNA mientras que las enzimas de tipo II introducen rupturas transitorias en la doble hebra de DNA. En la Figura 18.7 se ilustra la forma en la que estos cortes temporales afectan al superenrollamiento del DNA. Las topoisomerasas de tipo I inducen la relajación cortando una hebra de la doble hélice, permitiéndole al DNA rotar y a la hebra no cortada pasar a través del agujero antes de que la hebra rota se vuelva a sellar. Por el contrario, las topoisomerasas de tipo II inducen la relajación cortando las dos hebras de DNA y pasando un segmento de la doble hélice no cortada a través de la ruptura antes de que sea sellada. A diferencia de la reacción de la enzima tipo I, la acción de las topoisomerasas de tipo II requiere energía derivada de la hidrólisis de ATP.

Las topoisomerasas de tipo I y de tipo II se utilizan para eliminar superenrollamientos del DNA. Además, los procariotas tienen una topoisomerasa de tipo II denominada **DNA girasa** que puede inducir tanto la relajación como el superenrollamiento del DNA. Como aprenderemos en el Capítulo 19, la DNA girasa es una de las enzimas implicadas en la replicación del DNA. Puede relajar el superenrollamiento positivo que resulta del desenrollamiento parcial de una doble hélice, o puede introducir activamente vueltas negativas que promuevan la separación de las hebras, facilitando además el acceso a otras proteínas implicadas en la replicación del DNA. La DNA girasa requiere ATP para

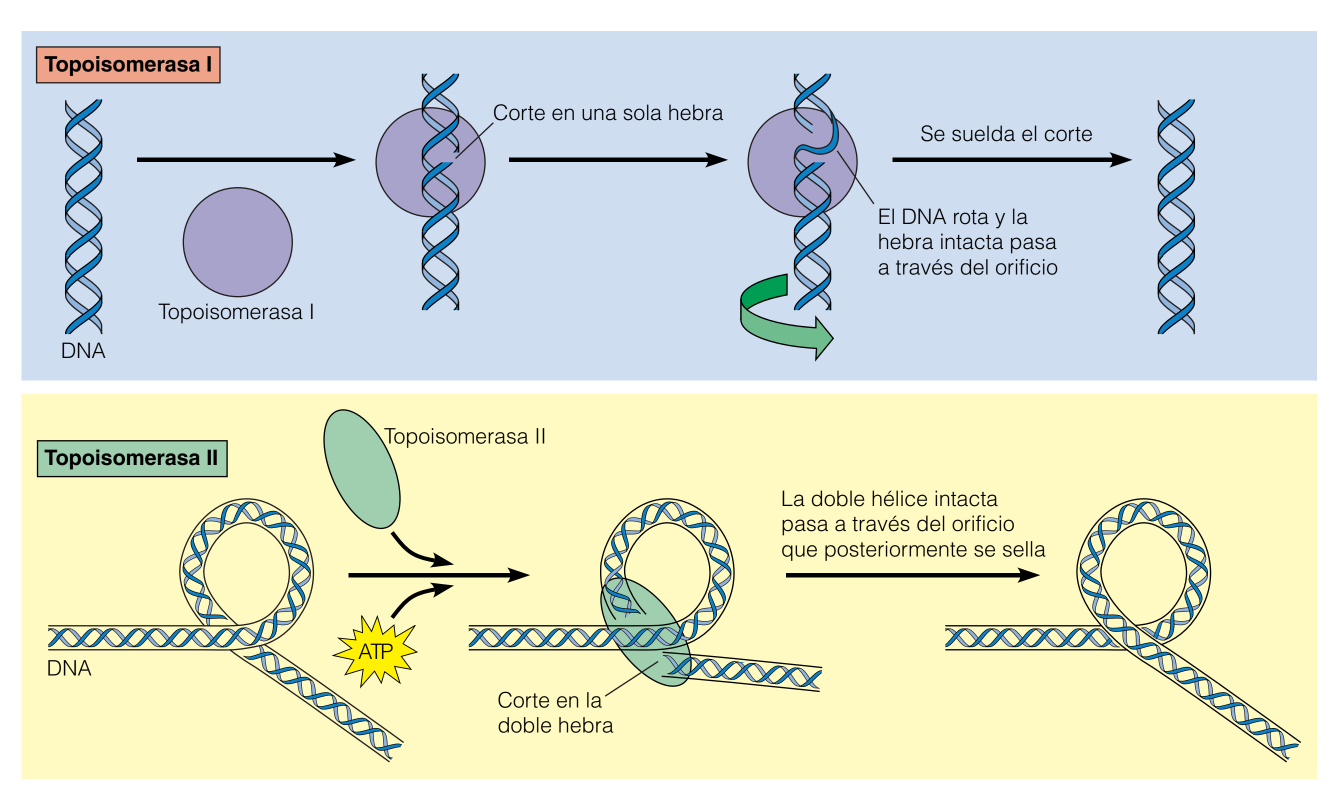


Figura 18.7 **Reacciones catalizadas por la topoisomerasa I y II.** *(Arriba)* La topoisomerasa I elimina los superenrollamientos porque rompe de manera transitoria una hebra de la doble hélice de DNA y pasa la hebra no cortada a través de la ruptura. *(Abajo)* La topoisomerasa II elimina superenrollamientos porque corta de manera transitoria las dos hebras de la doble hélice de DNA y pasa una región no cortada de la doble hélice de DNA a través del orificio. La DNA girasa es una topoisomerasa II que utiliza este mecanismo para eliminar superenrollamientos positivos y para introducir superenrollamientos negativos.

generar el superenrollamiento, pero no para relajar una molécula ya superenrollada.

Las dos hebras de una doble hélice de DNA se pueden separar por desnaturalización y volver a unirse por renaturalización

Debido a que las dos hebras de la doble hélice de DNA se mantienen unidas por enlaces no covalentes relativamente débiles, las dos hebras pueden separarse con facilidad bajo condiciones adecuadas. Como veremos en los próximos capítulos, la separación de las hebras es parte integral tanto de la replicación del DNA como de la síntesis de RNA. La separación de las hebras también se puede inducir de manera experimental teniendo como resultado la **desnaturalización del DNA**; el proceso inverso, que restablece una doble hélice a partir de hebras separadas de DNA, se denomina **renaturalización del DNA**.

Una forma de desnaturalizar DNA en el laboratorio es aumentando la temperatura. Si esto se hace lentamente, el DNA retiene su estado de doble hebra, o nativo, hasta que se alcanza una temperatura crítica, en ese punto la doble hebra se desnaturaliza rápidamente, o se «funde», en sus hebras componentes. El proceso de fusión es fácil de monitorizar debido a que el DNA de doble cadena y el DNA de cadena sencilla difieren en sus propiedades de absorción de luz. Todo el DNA absorbe la luz ultravioleta, con un máximo de absorción de alrededor de 260 nm. Cuando la temperatura de una solución de DNA se aumenta lentamente, la absorbancia a 260 nm se mantiene constante hasta que la doble hélice comienza a fundirse en sus hebras componentes. A medida que las hebras se separan, la absorbancia de la solución aumenta rápidamente debido a la elevada absorción intrínseca del DNA de cadena sencilla (Figura 18.8).

Se denomina **temperatura de fusión del DNA** (T_m) la temperatura a la cual se alcanza la mitad del cambio de absorbancia. El valor de la temperatura de fusión refleja la fuerza con la que se mantiene unida la doble hélice de DNA. Por ejemplo, la pareja de bases GC, que se mantienen unidas por tres puentes de hidrógeno, son más resistentes a la separación que la pareja de bases AT, que sólo tienen dos puentes de hidrógeno (*véase* Figura 18.4b). Además, la temperatura de fusión aumenta en proporción directa al número relativo de pares de bases GC en el DNA (Figura 18.9). Asimismo, las moléculas de DNA en las que las dos hebras están emparejadas correctamente en cada posición se fundirán a temperaturas más elevadas que el DNA en el que las dos hebras no sean perfectamente complementarias.

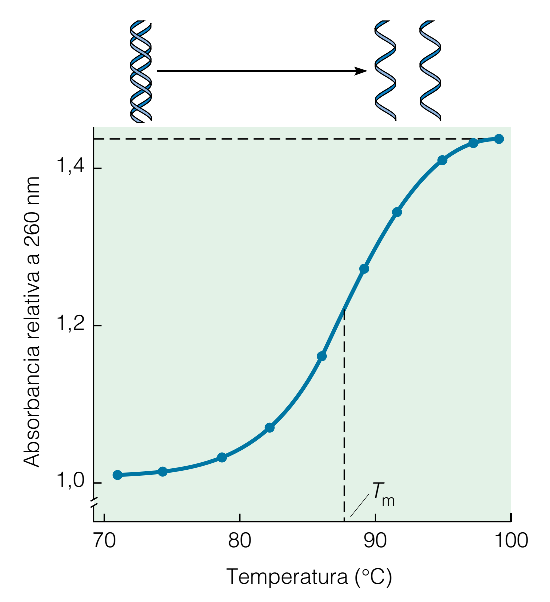


Figura 18.8 Perfil de desnaturalización térmica del DNA. A medida que la temperatura de una solución de DNA de doble cadena (nativo) se aumenta, se alcanza un punto en el cual la energía del calor causa que el DNA se desnaturalice rápidamente. La conversión en cadenas sencillas va acompañada de un aumento característico de la absorbancia de la luz a 260 nm. La temperatura a la cual se produce el punto medio de este aumento se denomina temperatura de fusión T_m. Para la muestra representada, el valor de T_m es de aproximadamente 87ºC

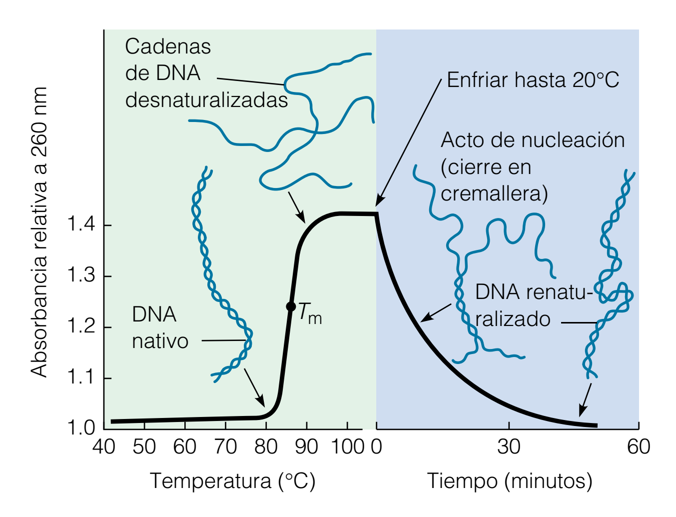


Figura 18.10 Desnaturalización y renaturalización del DNA. Si una solución de DNA nativo (de doble cadena) se calienta lentamente bajo condiciones controladas cuidadosamente, el DNA «se funde» en un estrecho rango de temperaturas, con un aumento de la absorbancia a 260 nm. Cuando se deja enfriar la solución, las hebras de DNA separadas se reasocian siguiendo una cinética que depende de la concentración inicial. Las cadenas complementarias colisionan aleatoriamente en el acto de nucleación que es seguido por un rápido «cierre en cremallera» de las parejas de nucleótidos adyacentes. La reasociación requiere cantidades variables de tiempo que dependen de la concentración de DNA en la solución y de la longitud de las cadenas de DNA.

El DNA desnaturalizado se puede renaturalizar disminuyendo la temperatura para permitir el restablecimiento de los puentes de hidrógeno entre las dos hebras (Figura 18.10). La capacidad de renaturalizar los ácidos nucleicos tiene una gran variedad de aplicaciones científicas. Lo que es más importante, forma la base de la **hibridación de los ácidos nucleicos**, una familia de procedimientos para identificar ácidos nucleicos, basada en la capacidad de las cadenas sencillas de unirse, o *hibridar,* con secuencias de bases complementarias. La hibridación de los ácidos nucleicos se puede aplicar a interacciones entre DNA-DNA, DNA-RNA e incluso RNA-RNA. Por ejemplo, en la hibridación DNA-DNA, el DNA que se examina se desnaturaliza y se incuba con un fragmento radiactivo de DNA de cadena sencilla, denominado **sonda**, cuya secuencia es complementaria a la secuencia de bases que se trata de detectar.

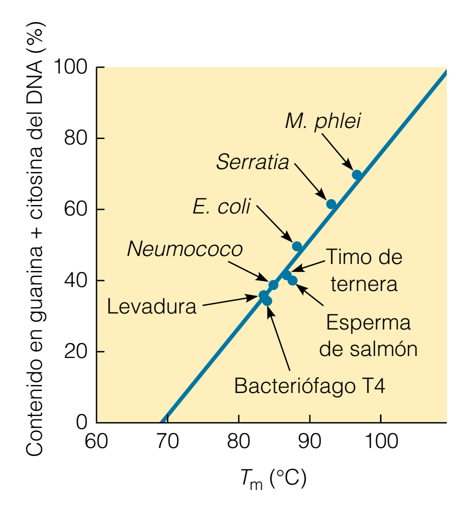


Figura 18.9 La temperatura de fusión depende de la composición de bases del DNA. La temperatura de fusión del DNA aumenta linealmente con su contenido de G + C, como se ilustra por la relación entre T_m y el contenido de G + C para muestras de DNA de varios organismos.

Las secuencias de ácido nucleico no necesitan ser perfectamente complementarias para poder hibridar. Cambiando la temperatura, la concentración de sales y el pH utilizado durante la hibridación se permite que tenga lugar el emparejamiento entre secuencias que presentan numerosas bases mal emparejadas. En estas condiciones, es posible detectar secuencias de DNA relacionadas entre sí pero no idénticas. Este abordaje es útil para identificar familias de genes relacionados en un tipo de organismo dado y entre diferentes tipos de organismos.

La organización del DNA en genomas

Hasta ahora, hemos considerado varias propiedades del DNA, tanto físicas como químicas. Pero, como biólogos celulares, estamos interesados de forma prioritaria en su importancia para la célula. Además, queremos saber cuánto

DNA tienen las células, cómo y dónde se almacena, y cómo utilizan la información genética que contienen. Empezaremos por preguntarnos por la cantidad de DNA presente, ya que esto determinará la máxima cantidad de información que una célula puede poseer.

El **genoma** de un organismo o de un virus comprende el DNA (o para algunos virus, RNA) que contiene una copia completa de toda la información genética de ese organismo o virus. Para muchos virus y procariotas, el genoma reside en una única molécula o en número pequeño de moléculas de DNA lineal o circular. Las células eucariotas tienen un genoma nuclear, un genoma mitocondrial y en el caso de plantas y algas, también un genoma cloroplástico. Los genomas de mitocondrias y cloroplastos son moléculas sencillas de DNA, normalmente circular, que se parecen a los de las bacterias. El genoma nuclear generalmente consiste en múltiples moléculas de DNA dispersas en un juego haploide de cromosomas. (Como estudiaremos con mayor detalle en el Capítulo 20, un juego *haploide* de cromosomas consiste en un representante de cada tipo de cromosomas, mientras que un juego *diploide* consiste en dos copias de cada tipo de cromosoma, una copia de la madre y otra del padre. Cada espermatozoide y cada óvulo tienen un juego haploide de cromosomas, mientras que la mayoría de los otros tipos de células eucariotas son diploides.)

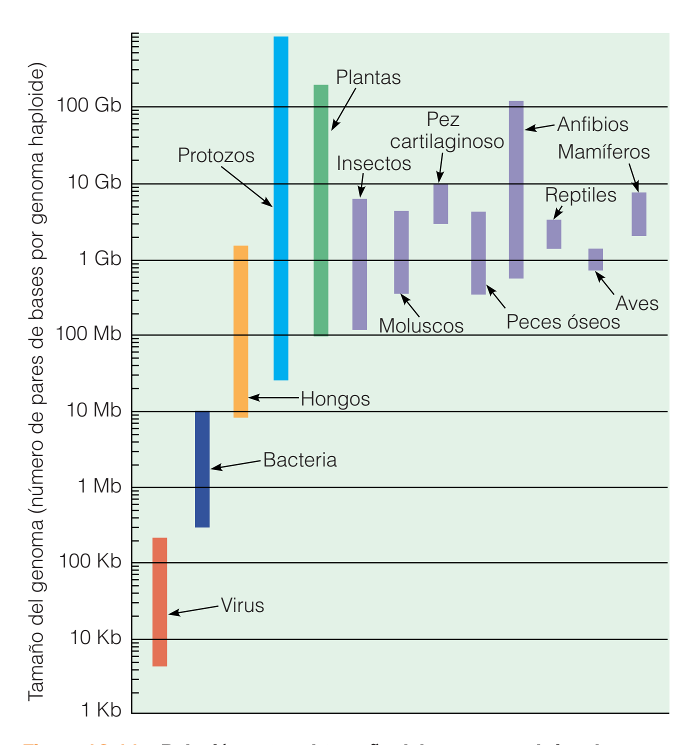


Figura 18.11 Relación entre el tamaño del genoma y el tipo de organismo. Para cada grupo de los organismos que se muestran, la barra representa el rango aproximado del tamaño del genoma, medido como el número de pares de nucleótidos por genoma haploide. Se usa el mismo color (morado) para los grupos que incluyen miembros del reino animal.

El tamaño del genoma normalmente aumenta con la complejidad del organismo

El tamaño del genoma normalmente se expresa como el número total de bases nucleotídicas emparejadas o **pares de bases** (**pb**). Por ejemplo, la molécula de DNA circular que constituye el genoma de una célula de *E. coli* tiene 4.639.221 pb. Puesto que estos números tienden a ser bastante largos, las abreviaturas **Kb** (Kilobases), **Mb** (Megabases) y **Gb** (Gigabases) se utilizan para referirse a miles, millones o billones de pares de bases, respectivamente. De esta manera, el tamaño del genoma de *E. coli* se puede expresar simplemente como 4,6 Mb. En la Figura 18.11 se resume el rango de tamaños de genomas observados en varios grupos de organismos. Estos datos revelan la existencia de una gama de casi ocho órdenes de magnitud en el tamaño del genoma, que va desde unos pocos miles de pares de bases para el virus más simple a más de cien billones de pares de bases para ciertas plantas y anfibios. En términos de longitud total de DNA, esto corresponde a un rango de menos de 2 μm de DNA para un virus pequeño, como el SV40, a aproximadamente 34 metros de DNA (¡más de 30 metros!) para ciertas plantas, tal como la flor silvestre *Trillium.*

Hablando en términos generales, el tamaño del genoma aumenta con la complejidad del organismo. Los virus contienen suficientes ácidos nucleicos como para codificar solamente unas pocas o unas pocas docenas de proteínas, las bacterias pueden codificar unos pocos miles de proteínas y las células eucariotas tienen bastante cantidad de DNA (al menos en teoría) como para codificar cientos de miles de proteínas. Pero un examen más exhaustivo de los datos revela características sorprendentes. La más notable de ellas, es que el tamaño del genoma de los eucariotas presenta grandes variaciones que no se correlacionan con ninguna diferencia conocida en cuanto a la complejidad del organismo. Por ejemplo, algunos anfibios y plantas, tienen genomas gigantescos que son decenas o incluso cientos de veces mayores que los de otras especies de mamíferos, anfibios o plantas.

Por ejemplo, *Trillium*, es un miembro de la familia de los lirios que no tiene necesidades evidentes como para presentar cantidades excepcionales de información genética. Sin embargo, el tamaño de su genoma es más de 20 veces el de la planta del guisante y 30 veces el de los humanos. Además, una ameba con una única célula tiene un genoma que tiene 200 veces el tamaño del genoma humano. No tenemos ni idea de por qué las plantas de la familia de los lirios y las amebas poseen tanto DNA. Su presencia destaca el hecho de que la mayoría de los genomas eucarióticos portan grandes cantidades de DNA de función desconocida, un fenómeno sobre el que trataremos en breve. Como análisis final, el tamaño del genoma es menos importante que el número e identidad de los genes funcionales y de las secuencias de DNA que controlan su expresión.

Las enzimas de restricción cortan las moléculas de DNA por sitios específicos

Puesto que las similitudes y diferencias heredables que se observan entre los organismos derivan de su DNA, podemos esperar que el estudio de las moléculas de DNA produzca importantes avances biológicos. Las pistas para multitud de misterios —desde el control de la expresión génica en la célula hasta la evolución de nuevas especies— deberían encontrarse en la secuencia de nucleótidos del DNA genómico. Sin embargo, la mayoría de las moléculas de DNA son demasiado grandes para ser estudiadas intactas. De hecho, hasta principios de los años 70, el DNA era la molécula biológica más difícil de analizar bioquímicamente. El DNA eucariótico parecía ser especialmente intimidatorio, dado el tamaño de la mayoría de los genomas eucarióticos, y no se conocía ningún método para cortar el DNA en sitios específicos para obtener fragmentos reproducibles. La posibilidad de ser alguna vez, capaz de identificar, aislar, secuenciar o manipular genes eucarióticos específicos, parecía improbable. Sin embargo, en menos de una década, el DNA se ha convertido en una de las moléculas biológicas con las que es más sencillo trabajar.

Este gran paso adelante se ha hecho posible por el descubrimiento de las **enzimas de restricción**, que son enzimas, aisladas a partir de bacterias, que cortan las moléculas de DNA extraño en sitios específicos. (El Anexo 18B describe el papel biológico de las enzimas de restricción y algunos detalles acerca de los sitios en los que cortan; aquí nos centraremos en su uso como herramientas analíticas.)

La acción de corte de una enzima de restricción genera un grupo específico de fragmentos de DNA denominados *fragmentos de restricción*. Cada enzima de restricción rompe DNA de doble cadena sólo en aquellos lugares donde encuentra una secuencia específica a la que reconoce, denominada **sitio de restricción**, que tiene normalmente entre cuatro y seis nucleótidos de longitud (aunque pueden ser ocho o más). Por ejemplo, éste es el sitio de restricción que reconoce la enzima de restricción de *E. coli*, denominada *Eco*RI, más ampliamente utilizada:

```
    ↓
5′ G—A—A—T—T—C 3′
3′ C—T—T—A—A—G 5′
              ↑
```

Las flechas indican dónde corta *Eco*RI al DNA. Esta enzima de restricción, como muchas otras, hace un corte escalonado en la doble hebra de la molécula de DNA, como se puede ver en la Figura 18B.1b (Anexo 18B).

La frecuencia con la que los sitios de restricción aparecen en el DNA es tal que una enzima de restricción dada, romperá el DNA en fragmentos que van, desde unos pocos cientos de pares de bases de longitud, a unos pocos miles de pares de bases. Los fragmentos de estos tamaños son, con mucho, más fáciles de manipular posteriormente que las moléculas de DNA, enormemente largas, a partir de las cuales se han generado.

Separación de los fragmentos de restricción mediante electroforesis en gel. Incubar una muestra de DNA con una enzima de restricción específica produce una colección de fragmentos de restricción de tamaños diferentes. Para determinar el número y longitudes de tales fragmentos y para aislar fragmentos individuales para estudios posteriores, debemos ser capaces de separar unos fragmentos de otros. La técnica de elección para este propósito es la **electroforesis en gel**, esencialmente el mismo método utilizado para separar proteínas y polipéptidos (*véase* Figura 7.22). De hecho, el procedimiento para el DNA es incluso más simple que para proteínas, debido a que las moléculas de DNA tienen una carga negativa inherente (debido a sus grupos fosfato) y por tanto no necesita ser tratada con un detergente cargado negativamente para hacer que se muevan hacia el ánodo. Los pequeños fragmentos de DNA, normalmente se separan en *geles de poliacrilamida*, mientras que los fragmentos más grandes se separan en geles más porosos hechos del polisacárido *agarosa*.

La Figura 18.12 ilustra la separación de fragmentos de restricción de diferentes tamaños por electroforesis en gel. Las muestras de DNA se incuban primero con la enzima de restricción deseada; en la figura se utilizan tres enzimas de restricción diferentes. Las muestras se colocan entonces en un extremo del gel en compartimentos separados («pocillos»). Posteriormente, y con el ánodo situado en el extremo opuesto a donde se encuentran las muestras, se le aplica al gel un potencial eléctrico. Debido a la carga negativa de sus grupos fosfatos, los fragmentos de DNA migrarán hacia el ánodo. Los fragmentos más pequeños (es decir, aquéllos con el peso molecular más bajo) se moverán en el gel con relativa facilidad y por tanto migrarán rápidamente, mientras que los fragmentos más grandes se moverán más lentamente. La corriente se mantiene hasta que los fragmentos estén bien separados en el gel. El resultado final son una serie de fragmentos de DNA que se han separado basándose en diferencias de tamaño.

Los fragmentos de DNA en el gel se visualizan o tiñendo o utilizando DNA marcado radiactivamente. Una técnica de tinción común implica empapar el gel en el colorante *bromuro de etidio*, que se une al DNA y fluoresce en naranja cuando se expone a la luz ultravioleta. Si los fragmentos de DNA son radiactivos, su localización se puede determinar por **autorradiografía**, una técnica para detectar moléculas radiactivas revistiendo la muestra con película fotográfica. Cuando se revela la película, produce un *autorradiograma* que está más oscuro allí donde la radiactividad ha interaccionado con la película. Después de localizar de esta forma los fragmentos individuales de DNA, se pueden extraer del gel para ser estudiados con posterioridad.

Mapa de restricción. ¿Cómo determina el investigador el orden en el que un conjunto de fragmentos de restricción se dispone en una molécula de DNA? Una aproximación al

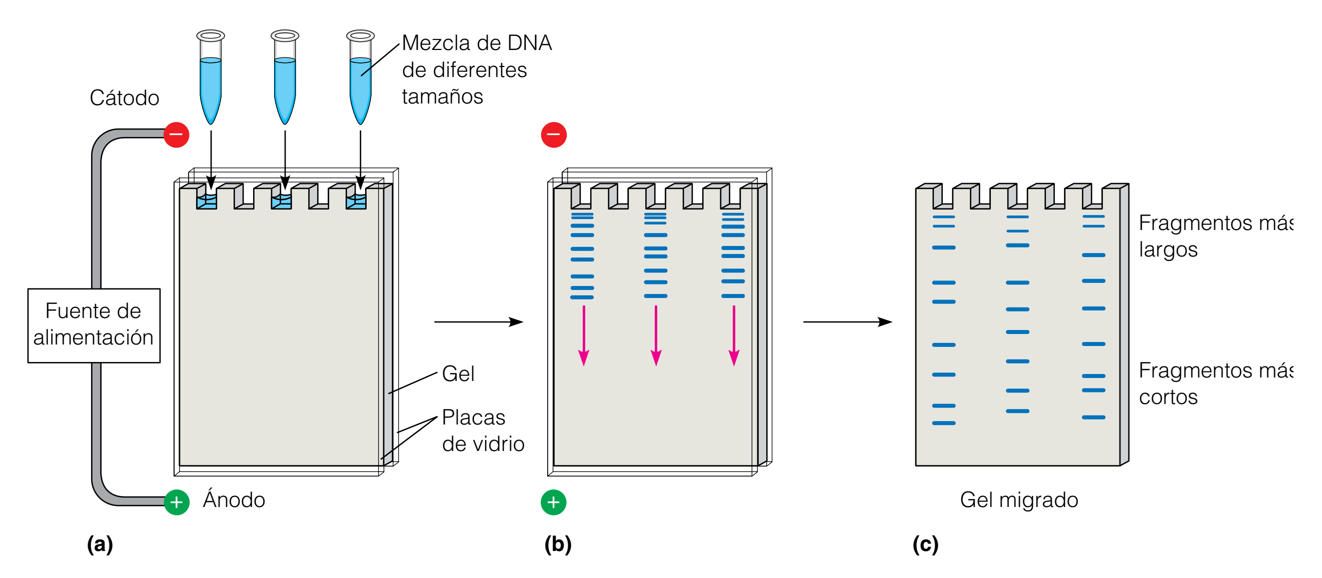


Figura 18.12 Electroforesis en gel del DNA. (**a**) Los tres tubos de ensayo contienen mezclas de fragmentos de DNA producidos por la incubación de muestras de DNA con diferentes enzimas de restricción. Para fraccionar una preparación de DNA que contiene fragmentos de varios tamaños, se deposita una pequeña muestra de la preparación en la parte superior del gel. Entonces, se aplica un potencial eléctrico de varios cientos de voltios a través del gel, de forma que el ánodo (electrodo positivo) está en la parte inferior del gel y el cátodo (electrodo negativo) en la parte superior. (**b**) Los fragmentos de DNA de la muestra depositada migran hacia el ánodo, desplazándose más rápidamente los fragmentos cortos que los largos. (**c**) Después de un tiempo suficiente para que se separen los fragmentos, se retira el gel y se tiñe con un colorante como el bromuro de etidio que se une a los fragmentos de DNA y les hace fluorescentes bajo la luz ultravioleta. Como alternativa, puede usarse la autorradiografía para localizar las bandas de DNA en el gel si el DNA se ha marcado radiactivamente.

estudio implica tratar al DNA con dos o más enzimas de restricción, solas o combinadas, seguido de una electroforesis en gel para determinar el tamaño de los fragmentos de restricción resultantes. La Figura 18.13 muestra cómo funcionaría para una molécula sencilla de DNA tratada con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Hae*III. En este ejemplo, cada enzima de restricción de forma individual corta el DNA en dos fragmentos, indicando que el DNA sólo contiene un sitio de restricción para cada enzima. Basándonos solamente en esta información, se pueden proponer dos posibles mapas de restricción (*véanse* los mapas A y B en la parte de abajo de la Figura 18.13). Para determinar cuál de los dos mapas es el correcto se debe realizar un experimento en el que la molécula de DNA de partida se debe cortar *simultáneamente* con *Eco*RI y *Hae*III. El tamaño de los fragmentos producidos por la digestión simultánea con las dos enzimas revela que el mapa A debe ser el correcto.

En la práctica, los mapas de restricción implican datos que son considerablemente más complejos que en nuestro sencillo ejemplo. En esas situaciones, los fragmentos de DNA producidos por cada enzima de restricción pueden ser aislados físicamente —cortando el gel, por ejemplo, en porciones y extrayendo el DNA de cada porción—. Los fragmentos aislados se cortan de manera individual con la segunda enzima de restricción, permitiendo así el análisis por separado de los sitios de corte en cada fragmento. El Problema 18.4 aporta un ejemplo de cómo se emplea este abordaje para construir un **mapa de restricción,** que represente la localización de todos los sitios de restricción en el DNA original.

Existen procedimientos rápidos para secuenciar DNA

Casi al mismo tiempo que se desarrollaron las técnicas para preparar fragmentos de restricción se idearon dos métodos para **secuenciar DNA** rápidamente —es decir, para determinar el orden lineal de las bases en el DNA—. Uno de los métodos fue concebido por Allan Maxan y Walter Gilbert, y el otro por Frederick Sanger y colaboradores. El método de Maxam-Gilbert, denominado el *método químico*, estaba basado en el uso de compuestos químicos (no proteicos) que cortan el DNA de manera preferente en bases específicas, mientras que el procedimiento de Sanger, denominado el método de *terminación de cadena*, utiliza *dideoxinucleótidos* (nucleótidos a los que les falta un grupo hidroxilo en 3′) que interfieren con la síntesis enzimática normal del DNA. Nos centraremos en el método de Sanger debido a que es el método que se ha adaptado para su uso en máquinas automáticas que se emplean actualmente en la mayoría de las tareas de secuenciación de DNA.

En este procedimiento, se emplea un fragmento de DNA de cadena sencilla como molde para guiar la síntesis de nuevas hebras de DNA complementario. La síntesis de DNA se realiza en presencia de *deoxinucleótidos* dATP, dCTP, dTTP y dGTP que son los sustratos normales que proporcionan las bases A, C, T y G a las cadenas de DNA en crecimiento. También se incluyen, aunque en menor concentración, los cuatro *dideoxinucleótidos* marcados con un colorante (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP) a los que les falta el grupo hidroxilo unido al carbono 3′ de los deoxinu-

Las enzimas de restricción en detalle

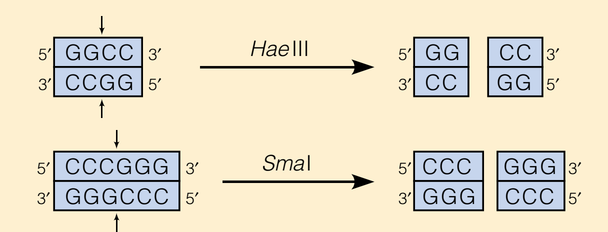
Las enzimas de restricción son un tipo de endonucleasa (una enzima que corta internamente el DNA) que se encuentran en muchas bacterias. Estas enzimas ayudan a las bacterias a protegerse contra la invasión por moléculas de DNA extrañas, particularmente por el DNA de bacteriófagos. De hecho, el nombre de enzima de «restricción» procede del descubrimiento de que estas enzimas *restringen* la capacidad del DNA foráneo para apoderarse de la maquinaria de transcripción y de traducción de la célula bacteriana.

Para proteger su propio DNA de ser degradado, la célula bacteriana tiene enzimas que añade grupos metilo ($—CH_3$) a nucleótidos específicos que de otra forma, serían reconocidos por sus propias enzimas de restricción. Una vez metilados, los nucleótidos ya no son reconocidos por las enzimas de restricción, de manera que el DNA bacteriano no es atacado por sus propias enzimas de restricción. Se dice de las enzimas de restricción que forman parte del **sistema de metilación/restricción** de la célula: el DNA extraño se rompe por la acción de las enzimas de restricción, mientras que el genoma bacteriano previamente se protege por metilación.

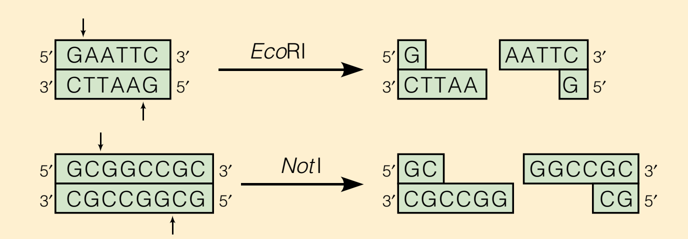
Las enzimas de restricción reciben su nombre a partir de la bacteria de la que se obtienen. Cada nombre enzimático deriva de la combinación de la primera letra del género de la bacteria con las dos primeras letras de la especie bacteriana. La cepa de la bacteria también se puede indicar, y si se han aislado dos o más enzimas a partir de la misma especie, las enzimas se numeran (usando números romanos) por orden de descubrimiento. Además, la primera enzima de restricción aislada a partir de la cepa R de *E. coli* se designa como *Eco*RI, mientras que la tercera enzima aislada a partir de *Hemophilus aegyptius* se denomina *Hae*III.

Las enzimas de restricción son específicas del DNA de doble cadena y digieren las dos cadenas. Cada enzima de restricción reconoce una secuencia específica de DNA que normalmente tiene una longitud de cuatro o seis (pero puede ser ocho o más) pares de nucleótidos. Por ejemplo, la enzima *Hae*III reconoce la secuencia de tetranucleótidos GGCC y rompe la doble hélice de DNA como se muestra en la Figura 18B.1a. Los sitios de restricción de otras enzimas de restricción se resumen en la Tabla 18B.1. Algunas enzimas de restricción como *Hae*III, cortan las dos hebras en el mismo punto, generando fragmentos de restricción de *extremos romos*. Otras enzimas de restricción digieren las dos hebras de manera escalonada, generando colas cortas de cadena sencilla o salientes, en ambos extremos. *Eco*RI es un ejemplo de este tipo de enzimas; reconoce la secuencia GAATTC y corta la molécula de DNA de manera compensada, dejando una cola AATT en ambos fragmentos (Figura 18B.1b). Los fragmentos de restricción generados por enzimas con este patrón de ruptura escalonada siempre dejan **extremos pegajosos** (también llamados *extremos cohesivos*). Estos términos derivan del hecho de que la cola de cadena sencilla del extremo de cada uno de esos fragmentos puede emparejar sus bases con cualquier extremo de cualquier otro fragmento generado por la misma enzima, causando que los fragmentos se peguen unos a otros por puentes de hidrógeno. Las enzimas que generan tales fragmentos son particularmente prácticas ya que se pueden emplear de manera experimental para crear moléculas de DNA recombinante, como veremos en el Capítulo 20.

Los sitios de restricción para la mayoría de las enzimas de restricción son *palíndromos*, lo que significa que la secuencia se lee igual en cualquier dirección. (La palabra inglesa *radar* es un palíndromo, por ejemplo.) La naturaleza palindrómica de un sitio de restricción se debe a su doble simetría de rotación, lo que significa que rotando la secuencia de doble cadena 180° en el plano del papel, se produce una secuencia que se lee igual que antes de la rotación. Los sitios de restricción palindrómicos



(a) Digestión por enzimas que producen extremos romos



(b) Digestión por enzimas que producen extremos cohesivos

Figura 18B.1 Digestión del DNA por las enzimas de restricción. (a) *Hae*III y *Sma*I son ejemplos de enzimas de restricción que cortan las dos hebras del DNA en el mismo sitio, generando fragmentos con extremos romos. (b) *Eco*RI y *Not*I son ejemplos de enzimas que cortan el DNA de manera escalonada, generando fragmentos con extremos cohesivos. Un «ingeniero» genético puede utilizar estos extremos pegajosos para unir fragmentos de DNA de orígenes diferentes como explicaremos en el Capítulo 20.

cleótidos normales. Cuando un dideoxinucleótido se incorpora a una cadena de DNA en crecimiento, en lugar de un deoxinucleótido normal, la *síntesis de DNA se detiene antes de tiempo* debido a la ausencia del grupo hidroxilo en 3′, que hace imposible la formación del enlace con el siguiente nucleótido. De esta forma, se producirán series de frag-

Tabla 18B.1 Enzimas de restricción de uso común y secuencias que reconocen

Enzima	Organismo de origen	Secuencia de reconocimiento*
*Ava*I	*Anabena variabilis*	5′ C↓Pi—C—G—Pu—G 3′ 3′ G—Pu—G—C—Pi↑C 5′
*Bam*HI	*Bacillus amyloliquefaciens*	5′ G↓G—A—T—C—C 3′ 3′ C—C—T—A—G↑G 5′
*Eco*RI	*Escherichia coli*	5′ G↓A—A—T—T—C 3′ 3′ C—T—T—A—A↑G 5′
*Hae*III	*Hemophilus aegyptius*	5′ G—G↓C—C 3′ 3′ C—C↑G—G 5′
*Hin*dIII	*Hemophilus influenzae*	5′ A↓A—G—C—T—T 3′ 3′ T—T—C—G—A↑A 5′
*Pst*I	*Providencia stuartii* 164	5′ C—T—G—C—A↓G 3′ 3′ G↑A—C—G—T—C 5′
*Pvu*I	*Proteus vulgaris*	5′ C—G—A—T↓C—G 3′ 3′ G—C↑T—A—G—C 5′
*Pvu*II	*Proteus vulgaris*	5′ C—A—G↓C—T—C 3′ 3′ G—T—C↑G—A—C 5′
*Sal*I	*Streptomyces albus* G	5′ G↓T—C—G—A—C 3′ 3′ C—A—G—C—T↑G 5′

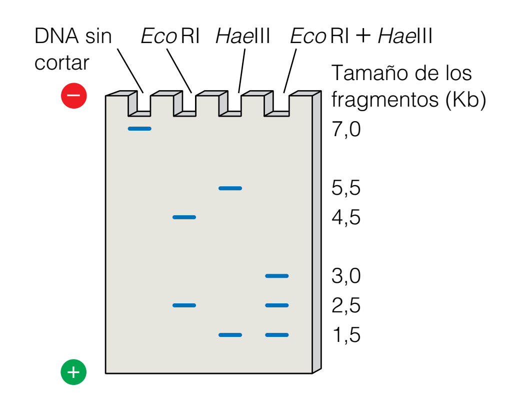
* Las flechas en los sitios de reconocimiento, indican los puntos en los que las enzimas de restricción digieren las dos hebras de la molécula de DNA. Pi = Pirimidina (C o T), Pu = Purina (G o A).

tienen la misma secuencia de bases en las dos hebras cuando se lee cada hebra en dirección 5′ → 3′.

La frecuencia con la que un sitio de restricción en particular, aparece en una molécula de DNA, se puede predecir de manera estadística. Por ejemplo, en una molécula de DNA que contiene cantidades iguales de las cuatro bases (A, T, G y C) podemos predecir que, aproximadamente, se produce un sitio de reconocimiento con cuatro pares de nucleótidos cada 256 (es decir, 4^4), mientras que la frecuencia probable para un sitio de seis nucleótidos es una de cada 4.096 pares de nucleótidos (es decir, 4^6). Además, las enzimas de restricción tienden a digerir el DNA en segmentos que normalmente varían en longitud de varios cientos a varios miles de pares de nucleótidos, esencialmente segmentos del tamaño de genes. Estos segmentos se denominan *fragmentos de restricción*. Puesto que cada enzima de restricción rompe en una secuencia de nucleótidos única y específica, siempre cortará una molécula dada de DNA de una manera predecible, generando un conjunto de fragmentos de restricción reproducibles. Esta propiedad hace de las enzimas de restricción herramientas muy poderosas para generar piezas de DNA de tamaños manejables para su posterior estudio.

mentos de DNA incompletos cuyos tamaños proporcionarán información relativa a la secuencia lineal de las bases en el DNA.

La Figura 18.14 ilustra cómo funciona este procedimiento. En el paso ①, se prepara una mezcla de reacción que incluye los dideoxinucleótidos ddATP, ddCTP, ddTTP



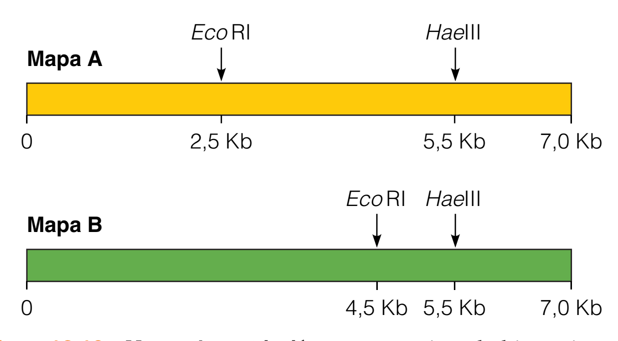


Figura 18.13 **Mapas de restricción.** En este ejemplo hipotético, se determina la localización de los sitios de restricción de *Eco*RI y *Hae*III en un fragmento de DNA de 7,0 Kb de longitud. El tratamiento de *Eco*RI corta el DNA en dos fragmentos que miden 2,5 Kb y 4,5 Kb lo que indica que se ha cortado el DNA en un solo punto localizado a 2,5 Kb de uno de los extremos. El tratamiento con *Hae*III corta el DNA en dos fragmentos que miden 1,5 Kb y 5,5 Kb lo que indica que se ha cortado el DNA en un solo punto localizado a 1,5 Kb de uno de los extremos. Se pueden proponer dos mapas de restricción posibles basándose sólo en esta información. Si el mapa A fuese correcto, la digestión simultánea del DNA con *Eco*RI y *Hae*III debería dar tres fragmentos de 3,0 Kb, 2,5 Kb y 1,5 Kb. Si el mapa B fuese correcto, la digestión simultánea del DNA con *Eco*RI y *Hae*III debería generar tres fragmentos de 4,5 Kb, 1,5 Kb y 1,0 Kb. Los datos experimentales revelan que el mapa A debe ser el correcto.

y ddGTP, cada uno marcado con un marcador fluorescente de distinto color. Ej., ddATP = rojo, ddCTP = azul, ddTTP = naranja y ddGTP = verde. Estos dideoxinucleótidos coloreados se mezclan con los deoxinucleótidos, sustratos naturales para la síntesis de DNA y a la molécula de DNA de cadena sencilla que se va a secuenciar y junto a un *cebador* (*primer*) corto de DNA de cadena sencilla complementario al extremo 3′ de la hebra de DNA que se va a secuenciar. Cuando se añade la DNA polimerasa, ésta cataliza la unión de los nucleótidos, uno a uno, al extremo 3′ del cebador, produciendo una hebra de DNA en crecimiento complementaria al molde de DNA cuya secuencia se está determinando. La mayoría de los nucleótidos que se insertan son deoxinucleótidos normales debido a que son los sustratos preferidos por la DNA polimerasa. Sin embargo, frecuentemente y al azar, un dideoxinucleótido coloreado se inserta en vez de su equivalente normal. Cada vez que se incorpora un dideoxinucleótido se detiene la síntesis de DNA para esa hebra en particular. Por lo tanto, se genera una mezcla de hebras de longitudes variadas. Cada una de las hebras, contiene una base coloreada en el extremo donde se ha detenido la síntesis antes de tiempo como consecuencia de la incorporación de un dideoxinucleótido (paso ②).

Posteriormente, la muestra se somete a electroforesis en un gel de poliacrilamida, que permitirá que los fragmentos de DNA recién sintetizados se separen unos de otros, ya que los fragmentos más cortos migrarán en el gel más rápidamente que los fragmentos más largos (paso ③). A medida que se desplazan en el gel, una cámara especial detecta los colores de los diferentes fragmentos según van pasando. El paso ④ muestra cómo esa información permite determinar la secuencia de bases del DNA. En este ejemplo en particular, el fragmento de DNA más corto es azul y el siguiente fragmento más corto es verde. Como el azul y el verde son los colores de ddCTP y de ddGTP, respectivamente, las dos primeras bases añadidas al cebador deben haber sido C seguida de G. En los secuenciadores automáticos, esa información se recoge para cientos de bases en fila y si se introduce en un ordenador permite determinar rápidamente la secuencia completa del fragmento de DNA inicial.

Se han secuenciado los genomas de numerosos organismos

El significado de la técnica que acabamos de describir apenas se puede estimar. Ahora, la secuenciación de DNA es algo frecuente y automatizado que se aplica de manera rutinaria no sólo para genes individuales sino también para genomas enteros. Aunque las máquinas que secuencian DNA sólo determinan la secuencia de fragmentos cortos de DNA, de unas 500 a 800 bases de largo, uno a uno, los programas de ordenador buscan secuencias de solapamiento entre esos fragmentos y de ese modo es posible ensamblar datos de cientos o miles de fragmentos de DNA en grandes tramos que pueden alcanzar longitudes de millones de bases.

Muchos de los éxitos iniciales en la secuenciación del genoma están relacionados con bacterias, ya que éstas poseen genomas relativamente pequeños, normalmente de unos pocos millones de bases. Ahora están disponibles las secuencias completas del DNA de más de 100 bacterias diferentes, incluyendo aquellas que causan varias enfermedades en los humanos. De hecho, los aparatos de secuenciación son tan eficaces que recientemente, un instituto de investigación informó de que había sido capaz de secuenciar el genoma de 15 bacterias diferentes ¡en un mes! Pero la secuenciación de DNA también se ha aplicado con éxito en genomas más grandes, incluyendo los organismos más importantes para la investigación biológica (Tabla 18.2). Por ejemplo, los científicos han completado la secuencia

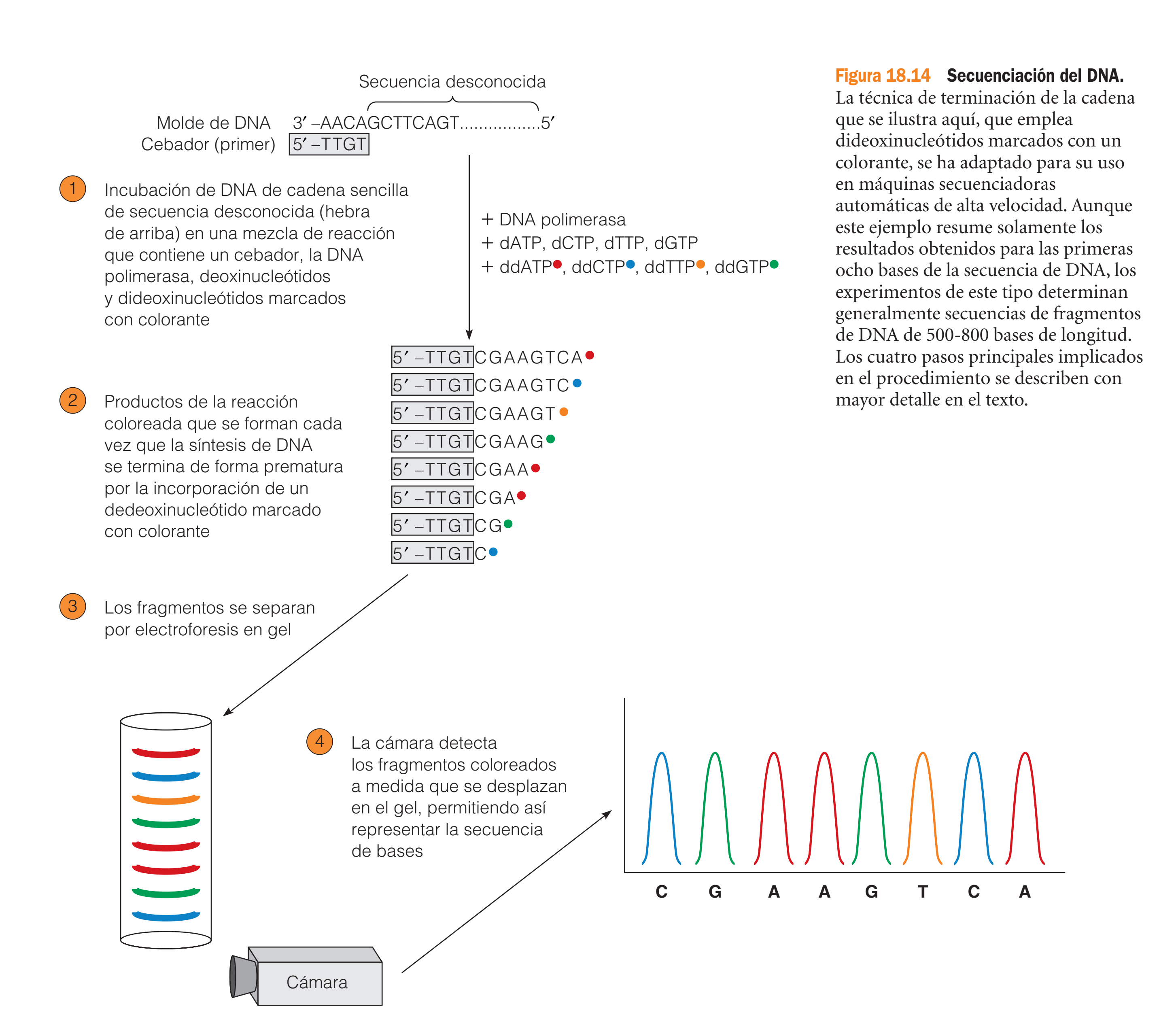


Figura 18.14 Secuenciación del DNA. La técnica de terminación de la cadena que se ilustra aquí, que emplea dideoxinucleótidos marcados con un colorante, se ha adaptado para su uso en máquinas secuenciadoras automáticas de alta velocidad. Aunque este ejemplo resume solamente los resultados obtenidos para las primeras ocho bases de la secuencia de DNA, los experimentos de este tipo determinan generalmente secuencias de fragmentos de DNA de 500-800 bases de longitud. Los cuatro pasos principales implicados en el procedimiento se describen con mayor detalle en el texto.

Tabla 18.2 Ejemplos de algunos genomas secuenciados

Organismo	Tamaño del genoma	Número estimado de genes
Bacteria		
Mycoplasma genitalium	0,6 Mb	470
Haemophilus influenza	1,8 Mb	1.740
Streptococcus pneumoniae	2,2 Mb	2.240
Escherichia coli	4,6 Mb	4.405
Levadura (*S. cerevisiae*)	12,1 Mb	6.200
Lombriz redonda (*C. elegans*)	97 Mb	19.700
Planta de la mostaza (*A. thaliana*)	125 Mb	25.500
Mosca de la fruta (*D. melanogaster*)	180 Mb	13.600
Ratón (*Mus musculus*)	2.500 Mb	30.000
Humano (*H. sapiens*)	3.200 Mb	30.000

genómica de la levadura *Saccharomices cerevisiae* (12,1 millones de bases), de la lombriz *Caenorhabditis elegans* (97 millones de bases), de la planta de la mostaza *Arabidopsis thaliana* (125 millones de bases) y de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (180 millones de bases).

Para nosotros, como seres humanos, el logro más importante de la secuenciación del DNA es, por supuesto, el genoma humano. ¿Cómo ha sido de impresionante ese desafío? Para contestar a esa cuestión necesitamos saber que el genoma nuclear humano contiene alrededor de 3,2 billones de bases que es aproximadamente 1.000 veces más que el DNA que está presente en una célula de *E. coli.* Una manera de entender la magnitud de semejante desafío es apuntar que a principios de los 90, cuando los esfuerzos para secuenciar genomas empezaron a ir en serio, el laboratorio de Frederick Blattner necesitó casi seis años para determinar la

secuencia de bases completa del genoma de *E. coli.* A esta velocidad, la secuenciación del genoma humano completo le habría supuesto a un único laboratorio ¡unos 6.000 años! En consecuencia, en 1990, los científicos acordaron el *Proyecto sobre el Genoma Humano*, un esfuerzo de cooperación internacional que implicaba a cientos de científicos que compartieron sus datos en un intento de determinar la secuencia completa del genoma humano. A finales de los 90, una compañía comercial, Celera Genomics, abordó también el asunto. Como resultado de estos esfuerzos, en abril de 2003, se determinó la secuencia completa del genoma humano, aproximadamente dos años antes de lo previsto.

El campo de la bioinformática ha emergido para descifrar genomas y proteomas

Sin duda, secuenciar el genoma humano ha sido una de las hazañas que ha coronado la biología moderna, no sólo debido a su magnitud y dificultad sino también a su impacto potencial sobre nuestros conocimientos sobre la evolución, fisiología y enfermedad humana. E incluso, desenmarañar la secuencia de bases era la parte «fácil». Ahora viene la parte difícil que es darle forma al significado de esta secuencia de 3 billones de A_{es}, G_{es}, C_{es} y T_{es}. Por ejemplo, ¿qué tramos del DNA corresponden a genes, cuándo y en qué tejidos se expresan esos genes, qué clase de proteínas codifican esos genes y cómo interactúan esas proteínas con otras y cómo funcionan?

La perspectiva de analizar ese enorme torrente de datos condujo a la identificación de una nueva disciplina, denominada **bioinformática**, que aúna la ciencia de los ordenadores con la biología en un intento de darle sentido a todo esto. Por ejemplo, los programas informáticos que analizan el DNA por tramos que podrían codificar secuencias de aminoácidos, se utilizan para estimar el número de genes que codifican proteínas. Estos análisis sugieren la presencia de unos 30.000 genes que codificarían proteínas en el genoma humano, aproximadamente de la mitad, no se conocía su existencia antes de la secuenciación del genoma. Lo más fascinante de esta estimación, es que esto significa que los humanos ¡tienen solamente el doble de los genes que tienen las lombrices o las moscas! El análisis por ordenador también ha revelado que solamente el 1 o el 2% del genoma humano codifica proteínas normalmente. Mientras que el DNA restante contiene elementos reguladores importantes así como algunos genes que codifican para productos del RNA en vez de proteínas, la mayoría parece consistir en DNA «basura» sin función aparente. (Lea por ejemplo, las discusiones sobre el DNA repetido en la siguiente sección y sobre los intrones en el Capítulo 21.) Mientras que la significación de todo este DNA no está clara, algunas evidencias sugieren que su presencia puede aumentar la capacidad del genoma de evolucionar a lo largo del tiempo.

Puesto que la función de la mayoría de los genes es producir proteínas y estas proteínas son las responsables de la mayoría de las funciones celulares, ahora los científicos miran más allá del genoma para estudiar el **proteoma** —la estructura y propiedades de cada proteína producida por el genoma—. La complejidad del proteoma de un organismo es considerablemente mayor que la de su genoma. Por ejemplo, se piensa que los aproximadamente 30.000 genes que se han encontrado en las células humanas, son capaces de producir entre 200.000 y más de un millón de proteínas. La razón por la cual las células pueden producir tantas proteínas a partir de un número más pequeño de genes se tratará en el Capítulo 23. Esencialmente, refleja el hecho de que un gen individual se puede leer de múltiples formas para producir versiones diferentes de su producto proteico, y que las proteínas resultantes están sujetas a modificaciones bioquímicas que pueden alterar de manera significativa sus propiedades estructurales y funcionales.

Identificar el enorme número de proteínas producidas por el genoma ha sido más fácil por la *espectrometría de masas* de alta velocidad, una técnica extremadamente sensible que utiliza campos magnéticos y eléctricos para separar proteínas o fragmentos de proteínas, basándose en diferencias de masa y carga. Una aplicación de la espectrometría de masas es identificar los péptidos derivados de proteínas separadas previamente por electroforesis en gel y digeridas posteriormente con proteasas específicas, como la tripsina. Comparando los datos resultantes con las masas de los péptidos que se producirían, según el pronóstico de las secuencias de DNA presentes en las bases de datos genómicos, se pueden identificar proteínas producidas por genes de reciente descubrimiento. Otras técnicas hacen viable el estudio de interacciones y propiedades funcionales en el enorme número de proteínas que se encuentran en un proteoma. Por ejemplo, es posible inmovilizar miles de proteínas diferentes (u otras moléculas que se unen a proteínas específicas) como minúsculas manchas en un trozo de vidrio más pequeño que un porta. Las *microcolecciones proteicas* resultantes (o «chips» de proteínas) se pueden usar para estudiar varias propiedades proteicas tales como la capacidad de cada mancha individual para unirse a otras moléculas añadidas a la solución circundante.

Además de las proteínas a las que codifica, otra característica importante del genoma humano es la manera en la que la secuencia de bases difiere entre personas. La secuencia del genoma humano publicada es en realidad un mosaico obtenido a partir del DNA aislado de 10 individuos diferentes. En la práctica, el 99,7% de las bases de su genoma se ajustarán perfectamente a esta secuencia publicada o con la secuencia de bases del DNA de su vecino de la puerta de al lado. Pero el 0,3% restante de las bases puede variar de una persona a otra, creando características que nos hacen individuos únicos. Estas variaciones en la secuencia de bases entre individuos se denominan **polimorfismos de un único nucleótido**, o **SNPs** (que se pronuncia «snips»). Aunque el 0,3% no suena a mucho, el 0,3% multiplicado por 3,2 billones de bases del genoma humano produce un total de

aproximadamente 10 millones de SNPs. Los científicos ya han creado una base de datos que contiene la mayoría de los SNPs más comunes; estas pequeñas variaciones genéticas se cree que son importantes ya que pueden influir probablemente en cómo se va a ver usted afectado por una enfermedad en particular o en cómo respondería a un tratamiento concreto.

El impacto de este cuerpo de datos genéticos en crecimiento se va haciendo evidente con descubrimientos relacionados con la base genética de muchas enfermedades humanas —desde el cáncer de mama y el de colon hasta la diabetes y la enfermedad de Alzheimer— sobre las que se está informando a un ritmo que aumenta rápidamente. Estos descubrimientos prometen revolucionar la práctica médica futura, ya que la capacidad para identificar genes de enfermedades e investigar su función hace posible concebir intervenciones médicas que alivien e incluso prevengan enfermedades.

Pero la capacidad de identificar genes potencialmente perjudiciales también aumenta las preocupaciones éticas, debido a que todos nosotros probablemente portamos unas pocas docenas de genes que nos exponen a algunos riesgos. Existe la posibilidad de que a esa información se le dé un mal uso —por ejemplo, la discriminación genética a individuos o grupos de personas por parte de las compañías de seguros, empleadores o agencias gubernamentales—. Además, el conocimiento en detalle del genoma humano aumenta el potencial de utilizar técnicas de DNA recombinante (*véase* Capítulo 20) para *alterar* los genes de la gente, no sólo para corregir enfermedades en tejidos corporales que no funcionan correctamente sino también para cambiar los genes de los espermatozoides y de los óvulos, y por extensión para alterar la composición genética de generaciones futuras. Cómo usar esas capacidades y cómo deberían regularse son cuestiones que afectan claramente a la comunidad científica pero también a toda la sociedad en su conjunto.

Las secuencias repetidas del DNA explican parcialmente el gran tamaño de los genomas eucarióticos

Además de las dificultades creadas por los estudios de secuenciación del DNA, el enorme tamaño del genoma humano plantea una cuestión más importante: ¿Son las grandes cantidades de DNA que se encuentran en las células de los humanos y de otros eucariotas superiores simplemente un reflejo de las necesidades de los miles de veces más de genes de los que están presentes en las células bacterianas o hay otros factores también en juego? Al final de la década de 1960 se produjo un gran paso adelante para contestar a esta cuestión, cuando los estudios de renaturalización del DNA llevados a cabo por Roy Britten y David Kohne condujeron al descubrimiento de las secuencias repetidas del DNA.

En los experimentos de Britten y Kohne, el DNA se cortó en pequeños fragmentos y se disoció en hebras sencillas por calentamiento. Se bajó entonces la temperatura para permitir que los fragmentos de cadena sencilla se renaturalizasen. La velocidad de renaturalización depende de la concentración de cada tipo de secuencia de DNA individual; cuanto más alta sea la concentración de una secuencia de DNA dada, mayor es la probabilidad de que colisione al azar con una hebra complementaria con la que se pueda reasociar. ¿Cómo se pueden comparar las propiedades de renaturalización de las diferentes clases de DNA? Como ejemplo, vamos a considerar el DNA derivado de una célula bacteriana y de una célula típica de mamífero que contiene mil veces más de DNA. Si esta diferencia en el contenido de DNA refleja diferencias del orden de mil veces en cuanto a las secuencias de DNA presentes, entonces el DNA bacteriano se debería renaturalizar 1.000 veces más deprisa que el DNA de mamífero. El fundamento subyacente en el que se basa esta predicción es que cualquier secuencia de DNA en particular, debería estar presente en una concentración mil veces más baja en la muestra de DNA de mamífero debido a que hay mil veces más de tipos de secuencias presentes, de manera que cada secuencia en particular representa una fracción más pequeña de la población total de secuencias.

De hecho, cuando Britten y Kohne realizaron sus estudios comparando la velocidad de renaturalización del DNA de mamíferos con respecto a bacterias, los resultados no fueron exactamente los esperados. En la Figura 18.15 se resumen los datos obtenidos para la renaturalización del DNA de una ternera y el de E. *coli*; la renaturalización se representa como una función de la concentración inicial de DNA multiplicado por el tiempo transcurrido. Este parámetro de la concentración de DNA por el tiempo, o C_0t, se emplea en lugar de solamente el tiempo, porque permite la comparación directa de los datos obtenidos a partir de reacciones realizadas a diferentes concentraciones de DNA. Cuando se representan los gráficos de esta forma, los datos revelan que

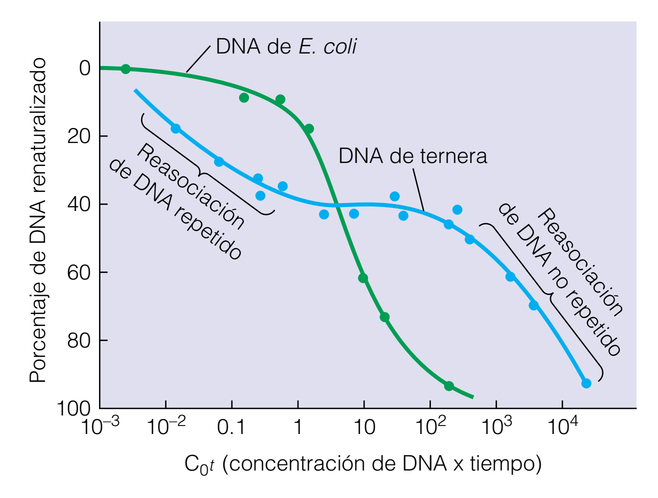


Figura 18.15 Renaturalización de DNA de ternera y de *E. coli*. El DNA de ternera que se reasocia más rapidamente que el DNA bacteriano consiste en secuencias repetidas.

el DNA de la ternera consta de dos clases de secuencias que se renaturalizan a velocidades claramente diferentes. Un tipo de secuencia que supone aproximadamente el 40% del DNA de ternera se renaturaliza más rápidamente (es decir, a valores más bajos de C_0t) que el DNA bacteriano. La explicación más sencilla de este resultado inesperado es que el DNA de ternera contiene secuencias de **DNA repetidas** que están presentes en múltiples copias. La existencia de copias múltiples aumenta la concentración relativa de tales secuencias, generando más colisiones y una velocidad de reasociación más rápida de lo que sería esperable si la secuencia estuviese presente en una única copia.

El 60% restante del DNA de ternera se renaturaliza alrededor de mil veces más despacio que el DNA de E. *coli*, que es el comportamiento esperado para secuencias que están presentes en copia única. Esta fracción se denomina **DNA no repetido** para distinguirlo de las secuencias repetidas que se renaturalizan más rápidamente. Las secuencias de DNA no repetido están presentes en una sola copia por genoma. La mayoría de los genes que codifican para proteínas consisten en DNA no repetido, aunque esto no significa que todo el DNA no repetido codifique para proteínas.

En las células bacterianas prácticamente todo el DNA es no repetido, mientras que en las eucarióticas presentan grandes variaciones en las proporciones relativas de secuencias repetidas y no repetidas. Esto proporciona una explicación, al menos en parte, del misterio de la cantidad aparentemente excesiva de DNA en especies como *Trillium*: este organismo contiene una proporción relativamente alta de secuencias de DNA repetidas. Usando las técnicas de secuenciación descritas anteriormente, los investigadores han determinado la secuencia de bases de varios tipos de DNAs repetidos y los han clasificado en dos categorías: *DNA repetido en tándem* y *DNA repetido disperso* (Tabla 18.3).

DNA repetido en tándem. Una de las categorías más importantes de DNA repetido se denomina **DNA repetido en tándem** ya que las múltiples copias se colocan una al lado de la otra en una fila —es decir, en tándem—. El DNA repetido en tándem supone el 10-15% del genoma típico de mamíferos y consiste en secuencias de DNA de muchos tipos diferentes que varían tanto en la longitud de la unidad básica que se repite como en el número de veces que esta unidad se repite de forma sucesiva. La longitud de la unidad repetida puede medir cualquier valor ente 1 y 2.000 pb más o menos. Sin embargo, la mayor parte de las veces, la unidad repetida es más corta de 10 pb; consecuentemente, esta subcategoría se denomina *DNA repetido de secuencia simple*. El siguiente es un ejemplo (se muestra solamente una hebra) de una secuencia simple de DNA repetido, formado a partir de una unidad de cinco bases, GTTAC:

…GTTACGTTACGTTACGTTACGTTAC…

El número de repeticiones secuenciales de la unidad de GTTAC puede ser tan elevado como varios cientos de miles, en sitios seleccionados del genoma.

El DNA repetido en tándem del tipo de secuencias simples se denominó originalmente *DNA satélite* porque, en muchos casos, esta composición de bases característica hace que aparezca en una banda satélite que se separa del resto del DNA genómico durante los procedimientos de centrifugación diseñados para separar moléculas por densidad. Esta diferencia en densidad surge como consecuencia de que la adenina y la guanina difieren ligeramente en el peso molecular, de la misma forma en que difieren la citosina y la timina; por lo tanto, las densidades de los DNAs con diferente composición de bases diferirán. En los procedimientos que revelan bandas satélites, el DNA genómico se corta en pequeños fragmentos y, por tanto, los segmentos de DNA de diferentes densidades son libres para migrar a diferentes posiciones durante la centrifugación.

¿Cuál es la función del DNA repetido de secuencia simple (DNA satélite)? Puesto que esas secuencias normalmente no se transcriben, se ha propuesto que podrían ser responsables de proporcionar propiedades físicas específicas a ciertas regiones del cromosoma. En la mayoría de los

Tabla 18.3 Categorías de secuencias repetidas en el DNA eucariótico

I. DNA repetido en tándem, incluyendo el DNA repetido de secuencia simple (DNA satélite)	
El 10-15% de la mayoría de los genomas de mamíferos son de este tipo	
Longitud de cada unidad repetida:	1-2.000 pb; normalmente 5-10 pb para DNA repetido de secuencia simple
Número de repeticiones por genoma:	10^2-10^5
Disposición de las unidades repetidas:	Tándem
Longitud total del DNA satélite en cada sitio:	
DNA satélite regular:	10^5-10^7 pb
DNA minisatélite:	10^2-10^5 pb
DNA microsatélite:	10^1-10^2 pb
II. DNA repetido disperso	
El 25 al 40% de la mayoría de los genomas de mamíferos son de este tipo	
Longitud de cada unidad repetida:	10^2-10^4 pb
Disposición de las unidades repetidas:	Dispersas por todo el genoma
Número de repeticiones por genoma:	10^1-10^6, «copias» no idénticas

eucariotas, las regiones del cromosoma denominadas **centrómeros** que desempeñan un papel importante en la distribución de los cromosomas durante la división celular (*véase* Capítulo 19) son particularmente ricas en repeticiones de secuencia simple, y es posible que estas secuencias le proporcionen al centrómero propiedades estructurales especiales. Los **telómeros,** que son secuencias de DNA localizadas en los extremos de los cromosomas, también tienen repeticiones de secuencia simples. En el siguiente capítulo, aprenderemos cómo los telómeros protegen a los cromosomas de la degradación de sus extremos vulnerables durante cada ciclo de replicación (*véase* Figura 19.16). Los telómeros humanos contienen entre 250-1.500 copias de la secuencia TTAGGG, lo cual se ha conservado extraordinariamente a lo largo de cientos de millones de años de evolución. Todos los vertebrados estudiados hasta el momento tienen secuencias repetidas idénticas, e incluso los eucariotas unicelulares poseen secuencias similares. Aparentemente, tales secuencias son críticas para la supervivencia de estos organismos.

La longitud total del DNA satélite encontrado en un sitio dado puede variar enormemememente. Los DNAs satélites típicos normalmente caen en el rango de longitud de 10^5 a 10^7 pares de bases. El término DNA *minisatélite* se refiere a regiones más cortas, de unas 10^2 a 10^5 pares de bases de longitud total, compuestas por repeticiones en tándem de entre aproximadamente 15 y 100 pb. Los DNAs *microsatélites*, en los que las unidades repetidas tienen entre 1 y 4 pb, son incluso más cortos (entre 10 y 100 pb por sitio), aunque numerosos sitios en el genoma pueden exhibir la misma secuencia. Las secuencias cortas repetidas que se observan en el DNA minisatélite y microsatélite son extraordinariamente útiles en el laboratorio para el estudio de las **huellas genéticas de DNA (DNA fingerprint)**. Este procedimiento descrito en detalle en el Anexo 18C usa la electroforesis en gel de fragmentos de restricción del DNA para comparar sitios distintos del genoma de dos o más individuos. Es una manera de identificar individuos tan precisa como el estudio de la huella genética convencional.

Los investigadores médicos han hecho el descubrimiento sorprendente de que varias enfermedades genéticas que afectan al sistema nervioso implican cambios en el DNA microsatélite. De manera más específica, estas enfermedades son fáciles de encontrar gracias al número excesivo de secuencias de trinucleótidos repetidas dentro de un gen que, de no tener estas repeticiones, sería normal. Un ejemplo de este fenómeno denominado *amplificación de tripletes repetidos* lo podemos encontrar en la *enfermedad de Huntington*, una enfermedad neurológica devastadora que aparece a mediana edad y que invariablemente es fatal. La versión normal del gen de la enfermedad de Huntington contiene el trinucleótido CAG repetido en tándem entre 11 y 34 veces. Sin embargo, los genes de los individuos afectados poseen más de 100 copias de esa unidad repetidas. El *síndrome del X frágil*, que es una causa importante de retraso mental, y la *distrofia miotónica*, que afecta a los músculos, se encuentran entre las enfermedades neurológicas que se originan como consecuencia de la amplificación de otro triplete de secuencias repetidas. En alguna de estas enfermedades, la secuencia repetida se encuentra en una región del gen afectado que no se traduce; en otras, se traduce en un segmento polipeptídico que consiste en una serie larga del mismo aminoácido. En ambos casos, la severidad de la enfermedad se correlaciona con el número de tripletes repetidos.

DNA repetido disperso. La segunda categoría principal de secuencias de DNA repetido, es el **DNA repetido disperso**. En lugar de estar dispuesto en secuencias agrupadas formando un tándem, las unidades repetidas de este tipo de DNA están esparcidas por todo el genoma. Una única unidad tiende a tener una longitud de cientos o incluso de miles de pares de bases, y sus «copias» dispersas, que pueden estar a cientos o a miles, normalmente son similares pero no idénticas a las otras. El DNA repetido disperso supone entre el 25 y el 40% de la mayoría de los genomas de mamíferos.

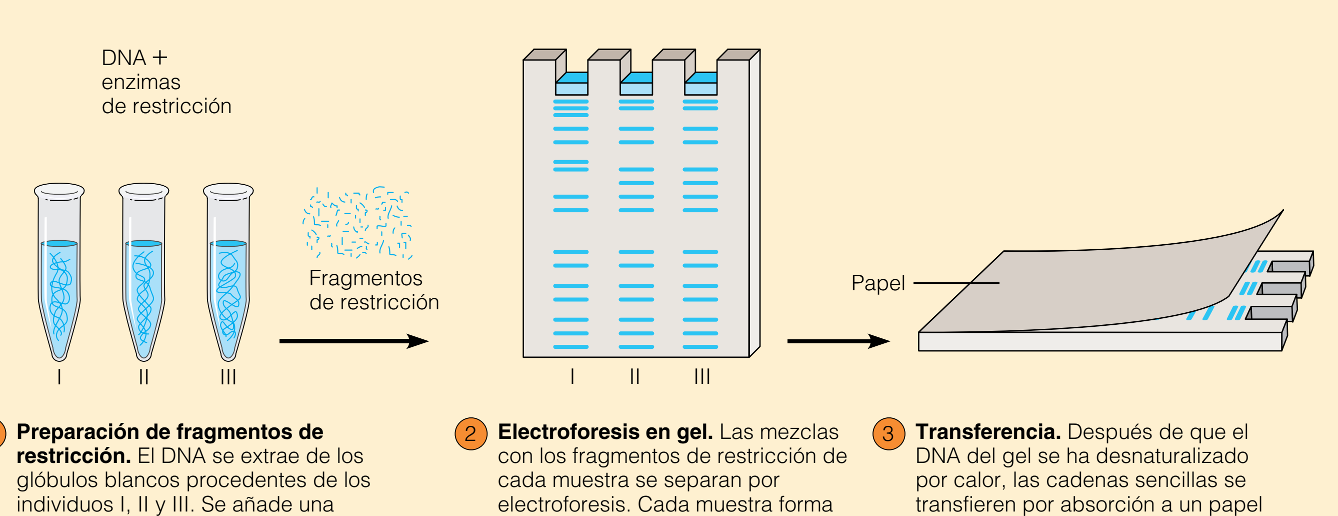
En humanos y otros primates, una gran porción del DNA repetido disperso consiste en una familia de secuencias relacionadas denominadas *familia Alu*, denominada así debido a que las primeras secuencias identificadas de esta familia contenían un sitio de restricción para la enzima de restricción *Alu*I. Una única unidad Alu tiene una longitud de alrededor de 300 pb y los cientos de miles de unidades Alu presentes en el genoma humano suponen más del 10% del genoma. La unidad Alu es similar, en secuencias de bases, a un tipo especial de RNA implicado en la síntesis de proteínas en el retículo endoplasmático rugoso (como componente de la partícula de reconocimiento de la señal, tratada en el Capítulo 22). Las secuencias Alu están también presentes en regiones que codifican proteínas de algunos genes, donde se piensa que contribuyen a la variabilidad proteica y a la evolución. Aunque las razones por las que el genoma mantiene tantas copias de secuencias dispersas tales como Alu no están claras, aunque sabemos cómo han surgido tantas copias. La mayoría de las secuencias dispersas repetidas son miembros de una clase especial de segmentos de DNA que se mueven y proliferan a lo largo del genoma dejando copias allí donde se paran. Los movimientos de estos elementos móviles de DNA, denominados **trasposones**, crean alteraciones genéticas de las que se cree que contribuyen a la adaptabilidad evolutiva del genoma. El origen y comportamiento de los trasposones se discutirá más ampliamente en el Capítulo 21.

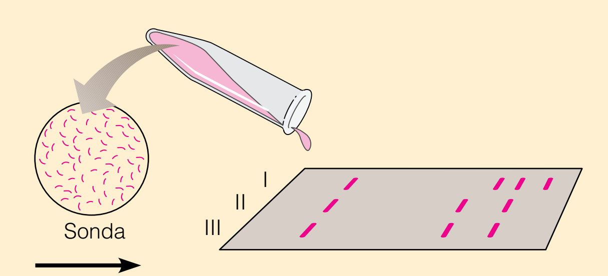
Concluimos esta sección sobre la organización del DNA apuntando que aplazaremos la discusión sobre algunos de los descubrimientos más interesantes obtenidos a partir de la genética molecular y de la secuenciación del DNA —a saber, la organización del DNA que constituye *genes*— hasta el Capítulo 21, donde trataremos la estructura de los genes en detalle.

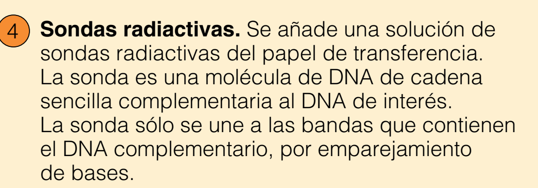
La huella genética de DNA (DNA fingerprint)

El análisis de los patrones fragmentos de restricción que se producen cuando se digiere el DNA con las enzimas de restricción se ha aprovechado para diversos propósitos, que varían desde la investigación en la organización de los genomas a aplicaciones prácticas tales como el diagnóstico de enfermedades genéticas o la resolución de crímenes con violencia. Las aplicaciones prácticas del análisis de los fragmentos de restricción, se basan en el hecho de que no hay dos personas (salvo gemelos idénticos) que tengan un juego exacto de secuencias de bases de DNA. Aunque las diferencias entre las secuencias de DNA de dos personas son muy pequeñas, alteran la longitud de alguno de los fragmentos de DNA producidos por las enzimas de restricción. Estas diferencias en la longitud de los fragmentos, que se denominan **polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción** (**RFLP**, del inglés restriction fragment length polymorphisms) se pueden analizar por electroforesis en gel. El patrón de fragmentos resultante sirve como «huella genética» que identifica a los individuos de los que se ha obtenido el DNA.

En la práctica, la técnica de la huella genética del DNA se realiza de tal forma que sólo se examina un pequeño y selecto grupo de bandas de fragmentos de restricción. Para ilustrar este punto, la Figura 18C.1 resume cómo podría utilizarse la huella genética del DNA para determinar si los individuos son portadores de un gen particular causante de una enfermedad, aunque puede que todavía no exhiban síntomas de esa enfermedad. En este ejemplo, imagine que los individuos I, II y III son miembros de una familia en la que es común el gen







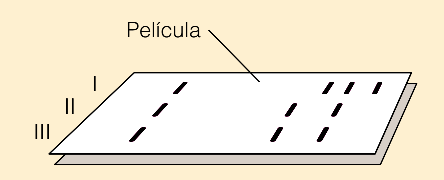


Figura 18C.1 **Huella genética de DNA por análisis con RFLP.**

causante de la enfermedad. Se sabe que el individuo I es portador del gen defectuoso, pero que el individuo II no, y queremos determinar el estatus genético de su hijo, el individuo III.

El paso clave en la huella genética del DNA se denomina **Hibridación de Southern** (del inglés Southern Blotting, desarrollada en 1975 por E. M. Southern), pero normalmente el procedimiento de la huella genética implica varios pasos distintos. En el paso ① de la Figura 18C.1, el DNA obtenido a partir de los tres individuos se digiere con una enzima de restricción. En el paso ②, los fragmentos resultantes se separan unos de otros mediante electroforesis en gel. Debido a que el DNA de cada persona representa un genoma completo, cientos de miles de bandas aparecerían en este estadio, si todas se hicieran visibles. Aquí es donde hizo su aparición el golpe de brillantez de Southern, con una técnica que nos permite distinguir las bandas de interés. En el proceso de hibridación de Southern paso ③ se presiona contra el gel terminado, un tipo especial de papel «de transferencia» (de nitrocelulosa o nylon), permitiendo que el patrón de fragmentos de DNA se transfiera al papel. En ④, se añade una *sonda* radiactiva a la transferencia. La sonda es simplemente una molécula radiactiva de DNA (o de RNA) de cadena sencilla cuya secuencia de bases es complementaria al DNA de interés —en este caso, el DNA del gen causante de la enfermedad—. La sonda se une a las secuencias complementarias del DNA por emparejamiento de las bases (el mismo proceso que ocurre cuando el DNA desnaturalizado se renaturaliza). En el paso ⑤, las bandas que se unen a la sonda radiactiva se hacen visibles por autorradiografía. Los resultados indican que la versión del gen del hijo concuerda con la del parental *sano*, individuo II.

Los autorradiogramas de la Figura 18C.2 ilustran el uso de la huella genética del DNA en un caso de asesinato. Aquí, el análisis de los RFLP determina que la sangre encontrada en la ropa del acusado procede de la víctima, implicando al acusado en el asesinato. Otra aplicación práctica de la huella genética del DNA en el área legal es en la determinación de la paternidad o de la maternidad.

Ahora, en muchas aplicaciones de la huella genética del DNA, los científicos analizan la longitud de secuencias cortas repetidas (DNA minisatélite) conocidas como **número variable de repeticiones en tánden** o **VNTRs** (del inglés, variable number tandem repeats). Los sitios VNTR elegidos para huella genética de DNA varían de manera importante su longitud entre personas, debido a la diferencia en el número de veces que se repite la unidad básica secuencialmente.

Como resultado, el patrón de VNTRs en el DNA de una persona se puede utilizar para identificar únicamente a un individuo. Por ejemplo, el DNA de tres sospechosos en un caso de asesinato podría tener, en cada uno de ellos, un número diferente de copias de la secuencia de dinucleótidos TG en un sitio concreto del genoma; uno podría tener 19 copias, otro, 21 copias y el tercero 32 copias. Las diferencias en los patrones de los fragmentos de restricción procederían de las diferencias en el número de unidades de TG repetidas, entre dos sitios de restricción que se cortan, más que de la presencia o ausencia de un sitio de corte, como sucede en los RFLPs tradicionales. En los casos criminales, se examina en el genoma de forma rutinaria la longitud de 13 sitios VNTR diferentes. La posibilidad de que dos individuos no relacionados presentaran exactamente el mismo perfil en los 13 sitios es aproximadamente de una en un millón de billones.

La utilidad de la huella genética de DNA se aumenta por la *reacción en cadena de la polimerasa* (*PCR*, del inglés, polymerase chain reaction), una técnica para hacer múltiples copias de DNA que se describirá en el Capítulo 19. Empezando con DNA aislado a partir de una única célula, la reacción de PCR se utiliza para sintetizar de forma selectiva millones de copias de una secuencia dada de DNA en unas pocas horas, produciendo con facilidad DNA suficiente como para realizar el análisis de la huella genética de los 13 sitios VNTR. De esta forma, unas pocas células de la piel, dejadas al tocar un bolígrafo o las llaves de un coche pueden producir el suficiente DNA para identificar a un individuo.

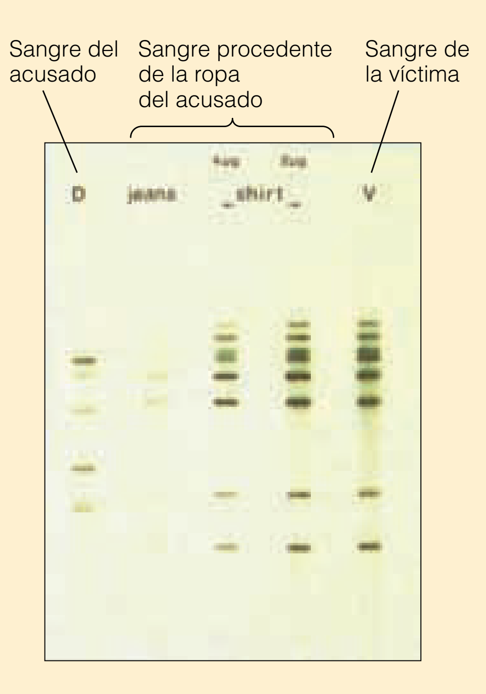


Figura 18C.2 **Huella genética de un caso de asesinato.** El DNA se aisló a partir de muestras de sangre del acusado y se compararon por análisis con RFLP, con DNA del acusado y con DNA de la víctima. El patrón de bandas del DNA de la mancha de sangre se ajusta al de la víctima, demostrando que la sangre de la ropa del acusado procede de la víctima. (Cortesía de Cellmark Diagnostics, Inc., Germantown, MD.)

Empaquetamiento del DNA

La cantidad de DNA que puede contener una célula es impresionante, incluso para organismos con genomas de dimensiones modestas. Por ejemplo, una célula típica de *E. coli* mide alrededor de 1 mm de diámetro y 2 mm de longitud, pero puede contener una molécula de DNA (circular) con una longitud de unas 1.600 mm —DNA suficiente para rodear a la célula ¡más de 400 veces!—. Las células eucariotas afrontan un desafío incluso mayor. Una célula humana de tamaño medio contiene suficiente DNA como para envolver a la célula más de 15.000 veces. De alguna manera todo este DNA debe estar empaquetado eficazmente en las células de manera que sea accesible a la maquinaria celular, tanto para la replicación del DNA como para la transcripción de genes específicos. Claramente, el empaquetamiento del DNA es un problema que supone un desafío para todas las formas de vida. Observaremos primero cómo llevan a cabo los procariotas esta tarea de organizar su DNA y después consideraremos cómo abordan el mismo problema los eucariotas.

Los procariotas empaquetan el DNA en cromosomas bacterianos y en plásmidos

Durante un tiempo se pensó que el genoma de procariotas como *E. coli* era una molécula «desnuda» a la que le faltaba cualquier elaboración y que tenía sólo cantidades triviales de proteínas asociada a ella. Ahora sabemos que la organización del genoma bacteriano es más parecida a la organización de los cromosomas eucariotas de lo que se había pensado previamente. Además, los genetistas bacterianos se referían a la estructura que contiene lo fundamental del genoma bacteriano como **cromosoma bacteriano**.

Cromosomas bacterianos. Generalmente, el cromosoma bacteriano es una molécula de DNA circular, que contiene alguna proteína unida, localizada en una región especial de la célula denominada **nucleoide** (Figura 18.16). Aunque el nucleoide no está rodeado por membrana, el cromosoma bacteriano que reside en esta región forma una masa de fibras con aspecto filamentoso, empaquetada de forma que mantiene unos límites diferentes entre el nucleoide y el resto de la célula. El DNA del cromosoma bacteriano está superenrollado negativamente y plegado en una extensa serie de bucles que por término medio tienen una longitud de 20.000 pb. Debido a que los dos extremos de cada bucle están anclados a los componentes estructurales que se encuentran en el nucleoide, el superenrollamiento de los bucles individuales se puede alterar sin influir en el superenrrollamiento de bucles adyacentes.

Se piensa que los bucles se mantienen en su sitio por el RNA y las moléculas proteicas. Se han obtenido evidencias del papel estructural del RNA en el cromosoma bacteriano a partir de estudios que demostraban que el tratamiento con ribonucleasa, una enzima que degrada el RNA, libera alguno de los bucles, aunque no relaja el superenrollamiento. Por otro lado, los pequeños cortes del DNA con una topoisomerasa, relajan el superenrollamiento pero no desorganizan los bucles. El DNA superenrollado que forma cada bucle se organiza en paquetes de cuentas que contienen pequeñas moléculas proteicas básicas análogas a las histonas de las células eucariotas (de las que se tratará en la próxima sección).

Las evidencias actuales sugieren que la molécula de DNA está envuelta alrededor de partículas de proteína básica. Incluso a partir de lo que sabemos hasta el momento, el cromosoma bacteriano consiste en DNA superenrollado unido a pequeñas proteínas básicas y plegado en dominios con bucles.

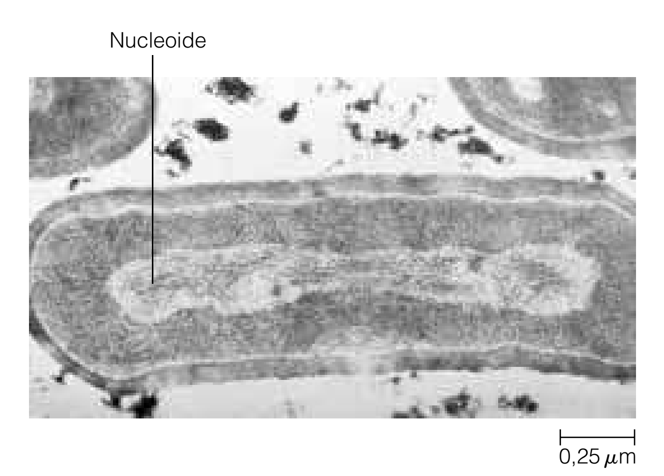




Figura 18.16 El nucleoide bacteriano. La micrografía electrónica de la izquierda muestra una célula bacteriana con un marcado nucleoide, que es la región donde reside el cromosoma bacteriano. Cuando se rompen las células bacterianas se libera el DNA cromosómico de la célula. La micrografía de la derecha muestra que el DNA liberado forma una serie de bucles que se mantienen unidos al armazón estructural del nucleoide (METs).

Plásmidos bacterianos. Además de su cromosoma, una célula bacteriana puede contener uno o más plásmidos. Los **plásmidos** son pequeñas moléculas de DNA circular que porta genes tanto para su propia replicación, como para una o más funciones celulares (normalmente funciones no esenciales). La mayoría de los plásmidos están superenrollados, dándoles una forma compacta, condensada. Aunque los plásmidos se replican de forma autónoma, la replicación está normalmente en suficiente sincronía con la replicación del cromosoma bacteriano como para asegurar un número de plásmidos, más o menos comparable, de una generación a la siguiente. En las células de *E. coli*, se reconocen tres clases de plásmidos. Los *factores F* (*fertilidad*) están implicados en los procesos de conjugación, un proceso sexual del que trataremos en el Capítulo 20. Los *factores R* (*resistencia*) portan genes que confieren a las bacterias resistencia a las drogas. Por último, los *factores col* (*colicinógeno*) permiten a las bacterias secretar *colicinas*, compuestos que matan a otras bacterias a las que le falta el factor col. Además, algunas cepas de *E. coli* contienen *plásmidos crípticos*, que no tienen función conocida.

Los eucariotas empaquetan el DNA en cromatina y cromosomas

Cuando pasamos de las células procariotas a las eucariotas, empaquetar el DNA se vuelve más complicado. Lo primero es que están implicadas cantidades sustancialmente mayores de DNA. Cada cromosoma eucariota contiene una única molécula de DNA lineal de tamaño enorme. En las células humanas, por ejemplo, sólo *una* de estas moléculas de DNA puede tener 10 cm o más de largo, aproximadamente unas cien veces el tamaño de la molécula de DNA encontrado en un cromosoma típico bacteriano. En segundo lugar se introduce una mayor complejidad estructural mediante la asociación del DNA eucariótico con mayor cantidad y número de proteínas. Cuando se une a estas proteínas, el DNA se convierte en fibras de **cromatina** que miden de 10 a 30 nm de diámetro, que normalmente están dispersas en el núcleo. En el momento de la división celular (y en otras situaciones especiales), estas fibras se condensan y se pliegan en estructuras compactas, mucho mayores, en donde se hacen reconocibles los **cromosomas** individuales.

La proteína que tiene el papel más importante en la estructura de la cromatina son las **histonas**, un grupo de proteínas relativamente pequeñas cuyo contenido elevado en aminoácidos lisina y arginina les aporta una fuerte carga positiva. La unión de las histonas al DNA, que está cargado negativamente, se estabiliza además por puentes iónicos. En la mayoría de las células, la masa de histonas de la cromatina es aproximadamente igual a la masa de DNA. Las histonas se dividen en cinco grupos principales, designados como H1, H2A, H2B, H3 y H4. La cromatina contiene aproximadamente igual número de moléculas de histonas H2A, H2B, H3 y H4 y cerca de la mitad de esa cantidad de moléculas del tipo H1. Estas proporciones son extraordinariamente constantes entre las diferentes clases de células eucariotas, independientemente del tipo celular o de su estado fisiológico. Además de las histonas, la cromatina también contiene un grupo de diversas *proteínas no histonas* que desempeñan una gran variedad de papeles enzimáticos, estructurales, y reguladores.

Los nucleosomas son la unidad básica de la estructura de la cromatina

El DNA contenido dentro de un núcleo típico mediría un metro o más de longitud si estuviera completamente extendido, mientras que el núcleo en sí normalmente no mide más de 5-10 mm de diámetro. El plegamiento de tan enorme longitud de DNA en un núcleo que es casi un millón de veces más pequeño, supone un problema topológico significativo. Uno de los primeros hallazgos sobre el proceso de plegamiento surgió a finales de los años 60, cuando los estudios de difracción de rayos X llevados a cabo por Maurice Wilkins reveló que las fibras de cromatina purificada tienen una subunidad estructural que se repite que no se observa ni en el DNA ni en las histonas solas. Además, Wilkins concluyó que las histonas le imponen al DNA una organización estructural repetitiva. En 1974 se proporcionó una pista sobre cómo era la naturaleza de esta estructura, cuando Ada Olins y Donald Olins publicaron micrografías electrónicas de las fibras de cromatina aisladas a partir de células, de manera que se evitaban los solventes ácidos empleados en los primeros procedimientos realizados para preparar cromatina y examinarla al microscopio. Las fibras de cromatina vistas de esta forma parecen una serie de minúsculas partículas ancladas una a otra mediante un filamento fino. Esta apariencia de «collar de cuentas» sugirió que las cuentas estaban hechas de proteínas (presumiblemente histonas) y que el fino filamento que conecta las cuentas corresponde al DNA. Ahora nos referimos a cada cuenta junto a su DNA asociado, con el nombre de **nucleosoma** (Figura 18.17).

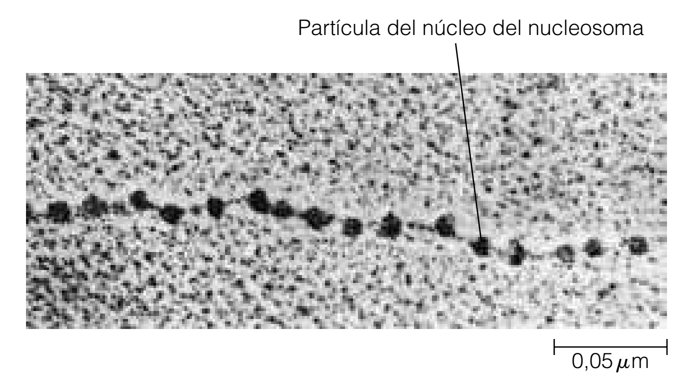


Figura 18.17 Nucleosomas. Las partículas del núcleo del nucleosoma parecen estructuras en forma de cuentas espaciadas a intervalos regulares a lo largo de las fibras de cromatina. Un nucleosoma se define por incluir una partícula central o del núcleo y un tramo de DNA que la conecta a la siguiente partícula central (MET).

Basándonos solamente en la microscopía electrónica habría sido difícil determinar si los nucleosomas son un componente normal de la cromatina o un artefacto generado durante la preparación de la muestra. Afortunadamente, Dean Hewish y Leigh Burgoyne informaron, casi al mismo tiempo y con evidencias independientes, de la existencia de una estructura repetitiva en la cromatina; descubrieron que los núcleos de las células del hígado de rata contenían una nucleasa capaz de cortar el DNA en fibras de cromatina. En un grupo de experimentos crucial, estos investigadores expusieron la cromatina a esta nucleasa y purificaron el DNA parcialmente degradado para retirar las proteínas de la cromatina. Cuando examinaron el DNA purificado, por electroforesis en gel, encontraron un patrón de fragmentos distintos, en el que el fragmento más pequeño de DNA medía alrededor de 200 pb de longitud y los fragmentos restantes eran exactamente múltiplos de 200 pb (Figura 18.18). Ya que la digestión de DNA libre de proteínas por la nucleasa, no generaba este patrón de fragmentos, concluyeron que (1) las proteínas de la cromatina están agrupadas a lo largo de la molécula de DNA con un patrón regular que se repite a intervalos de aproximadamente 200 pb, y (2) que el DNA localizado entre estos grupos de proteínas es susceptible de ser digerido por la nucleasa, proporcionando fragmentos que tienen una longitud múltiplo de 200 pb.

Estas observaciones plantearon la cuestión de si los grupos de proteínas de los que se había postulado que aparecían a intervalos de 200 pb se correspondían con las partículas esféricas observadas en las micrografías electrónicas de las fibras de cromatina. Contestar a esta cuestión requería una combinación de abordajes a la cuestión como eran la digestión con nucleasa y la microscopía electrónica. En estos estudios, la cromatina se exponía brevemente a la *nucleasa de micrococcus*, una enzima bacteriana que, como la nucleasa del hígado de rata, corta el DNA de la cromatina a intervalos de 200 pb. Entonces, la cromatina fragmentada se separaba en fracciones de varios tamaños por centrifugación y se examinaba a microscopía electrónica. Se encontró que la fracción más pequeña contenía partículas esféricas solamente, la siguiente fracción contenía grupos de dos partículas, la siguiente fracción tenía grupos de tres partículas, y así sucesivamente (Figura 18.19). Cuando se

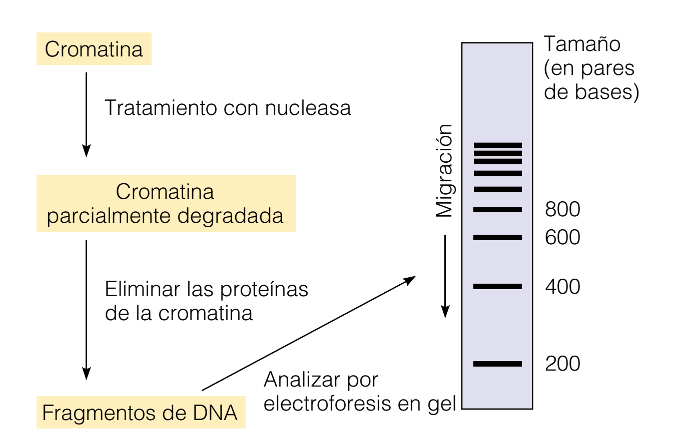


Figura 18.18 Prueba de que las proteínas se agrupan a intervalos de 200 pares de bases a lo largo de la molécula de DNA en las fibras de cromatina. En estos experimentos se analizaron por electroforesis en gel fragmentos de DNA generados por digestión con nucleasa a partir de cromatina de hígado de rata. El descubrimiento de que los fragmentos de DNA son múltiplos de 200 pb sugiere que las histonas se agrupan a intervalos de 200 pares a lo largo del DNA confiriendo por ello un patrón regular de protección contra la digestión por nucleasa.

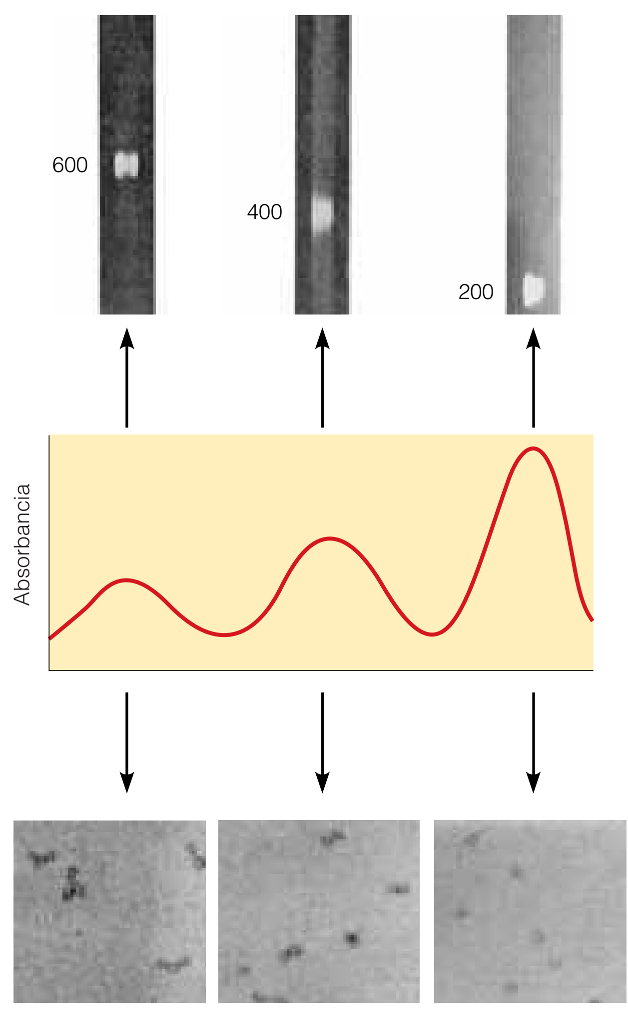


Figura 18.19 Prueba de la existencia de nucleosomas. La cromatina que había sido parcialmente degradada con nucleasa de micrococo se fraccionó por centrifugación en gradiente de densidad (gráfico central). Los picos individuales se analizaron entonces por microscopía electrónica (abajo) y por electroforesis en gel, tras eliminar las proteínas de la cromatina (arriba). El pico de la derecha consiste en partículas individuales de proteína asociadas con 200 pares de bases de DNA, el pico central consiste en grupos de dos partículas asociadas con 400 pares de bases de DNA y el pico de la izquierda consiste en grupos de tres partículas asociadas con 600 pares de bases de DNA. Esto indica que la unidad básica repetida de la cromatina es una partícula de proteína asociada con 200 pares de bases de DNA.

aislaba el DNA de estas fracciones y se analizaba por electroforesis en gel, el DNA procedente de la fracción que contenía sólo partículas medía 200 pb de largo, el DNA de la fracción que contenía los grupos de dos partículas medía 400 pb de largo, etc. De estos hallazgos se concluyó que cada una de las partículas esféricas observadas en las micrografías electrónicas estaba asociada a 200 pb de DNA. Esta unidad básica repetida, que contiene aproximadamente 200 pb de DNA asociado con una partícula proteica, es el nucleosoma.

El núcleo del nucleosoma está formado por un octámero de histonas

Los primeros indicios sobre la organización molecular del nucleosoma proceden del trabajo de Kornberg y sus colaboradores, quienes desarrollaron técnicas para ensamblar nucleosomas a partir de mezclas purificadas de DNA y proteína. Descubrieron que se podían generar fibras de cromatina compuestas por nucleosomas mezclando el DNA con las cinco histonas. Sin embargo, cuando intentaron usar las histonas purificadas de manera individual, descubrieron que los nucleosomas sólo se ensamblaban cuando se habían purificado las histonas mediante técnicas suaves que dejaban a la histona H2A unida a la histona H2B, y la histona H3 unida a la histona H4. Cuando estos complejos H3-H4 y H2A-H2B se mezclaban con el DNA, se reconstituían fibras de cromatina con una estructura nucleosomal normal. Por tanto, Kornberg concluyó que los complejos de histonas H3-H4 y H2A-H2B eran una parte integral del nucleosoma.

Para investigar con mayor profundidad la naturaleza de las interacciones entre las histonas, Kornberg y su colega, Jean Thomas, trataron la cromatina aislada con un reactivo químico que forma enlaces covalentes entre moléculas proteicas localizadas una al lado de otra. Después del tratamiento con este reactivo, las proteínas ancladas químicamente se aislaron y analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida. Con respecto a los complejos proteicos, en tales geles se hizo patente el tamaño de ocho moléculas de histona, sugiriendo que las partículas nucleosomales contienen un *octámero* de ocho histonas. Una vez que se supo que las histonas H3-H4 y las histonas H2A-H2B formaban complejos unidos estrechamente y que estas cuatro histonas estaban presentes aproximadamente en cantidades equivalentes en la cromatina, Kronberg y Thomas propusieron que los octámeros de histonas se creaban para mantener juntos dos dímeros H2A-H2B y dos dímeros H3-H4, y que la doble hélice de DNA se envolvía entonces alrededor del octámero resultante (Figura 18.20).

Un tema no tratado por el modelo precedente está relacionado con la importancia de la histona H1, que no forma parte del octámero. Si los nucleosomas individuales se aislan digiriendo rápidamente la cromatina con la nucleasa de micrococcus, la histona H1 todavía está presente (junto a las

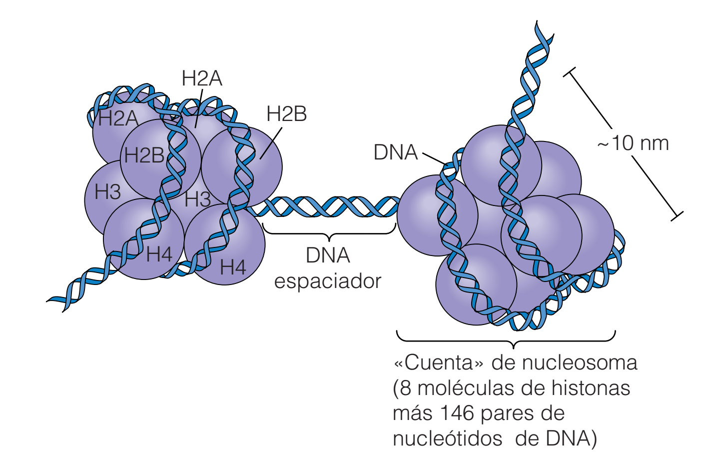


Figura 18.20 La estructura del nucleosoma con mayor detalle. Cada nucleosoma consiste en ocho moléculas de histona (dos de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4) asociadas con 146 pares de nucleótidos de DNA y un tramo de DNA espaciador de aproximadamente 50 pares de nucleótidos de longitud. El diámetro de las «cuentas» del nucleosoma o partícula central es de alrededor de 10 nm. Se cree que la histona H1 (no representada) se une al DNA espaciador y facilita el empaquetamiento de los nucleosomas en fibras de 30 nm.

otras cuatro histonas y a las 200 pb de DNA). Cuando la digestión se lleva a cabo durante más tiempo, el fragmento de DNA se sigue degradando hasta que alcanza una longitud de aproximadamente 146 pb; durante los pasos finales del proceso de digestión, se libera la histona H1. La partícula que queda consta de un octámero de histonas asociado a un DNA de 146 pb se denomina *partícula central o núcleo del nucleosoma*. El DNA que se degrada durante la digestión de 200 a 146 pb de longitud se denomina *DNA espaciador*, debido a que une un nucleosoma al siguiente (Figura 18.20). Puesto que la histona H1 se libera como consecuencia de la degradación del DNA espaciador, se piensa que las moléculas de histona H1 están asociadas a esta región. La longitud del DNA varía un tanto entre organismos, pero el DNA asociado al núcleo del nucleosoma siempre mide cerca de 146 pb, lo que es suficiente como para enrollarse alrededor de la partícula central aproximadamente 1,7 veces.

Los nucleosomas se empaquetan para formar fibras de cromatina y cromosomas

La formación de nucleosomas es sólo el primer paso en el empaquetamiento del DNA nuclear (Figura 18.21). Las fibras de cromatina aisladas dispuestas en «collar de cuentas» miden unos 10 nm de diámetro, pero, con frecuencia, la cromatina de las células intactas forman una fibra ligeramente más gruesa, de unos 30 nm de espesor, denominada **fibra de cromatina de 30 nm**. En preparaciones de cromatina aislada, las formas de 10 y 30 nm de cromatina se pueden interconvertir cambiando la concentración de sales de la solución. Sin embargo, la fibra de 30 nm no se forma en preparacio-

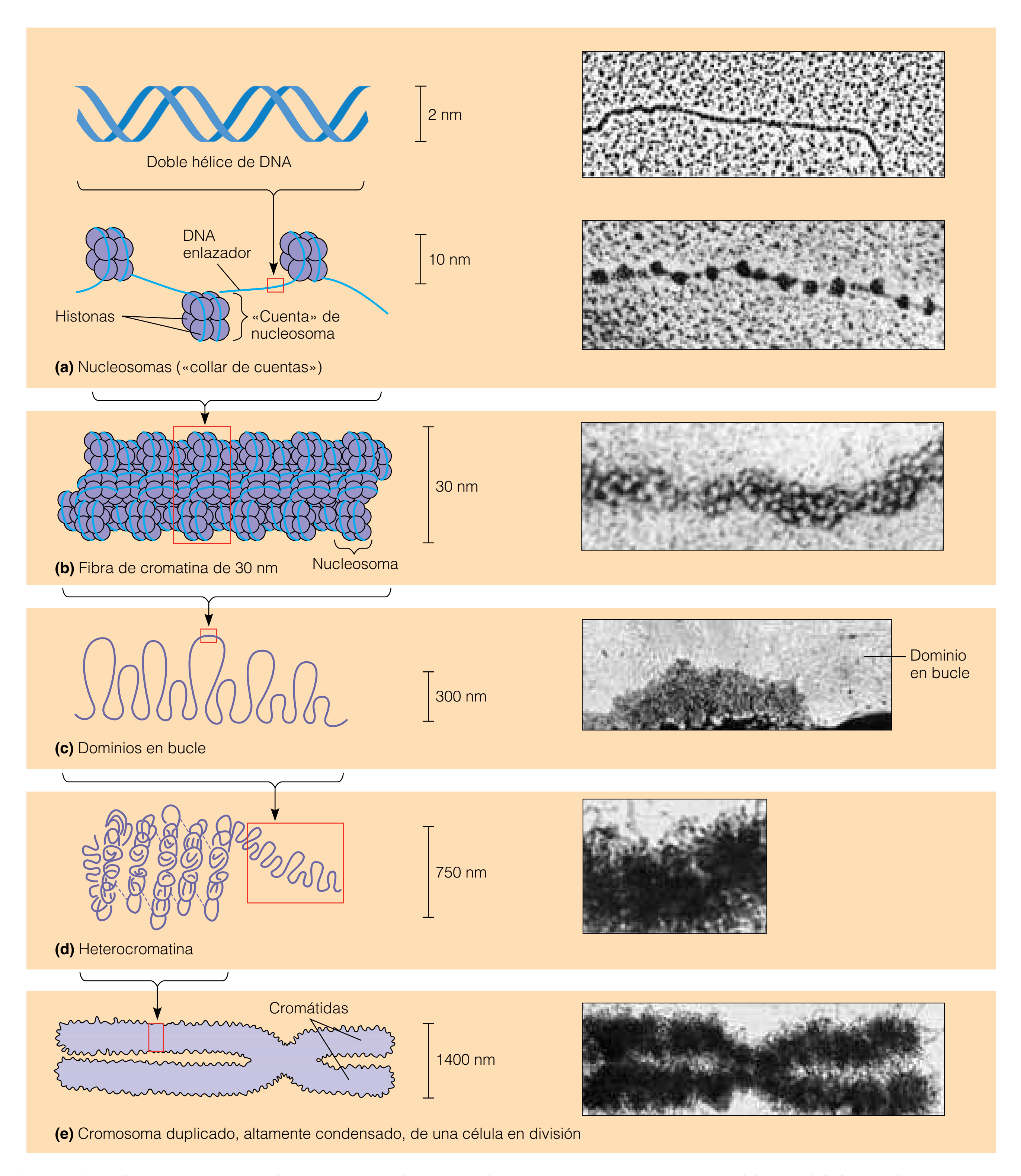


Figura 18.21 Niveles de empaquetamiento de la cromatina. Estos diagramas y METs muestran un modelo actual de los estadios progresivos de enrollamiento y plegamiento de DNA, que culminan en el cromosoma altamente compactado de una célula en división. (**a**) «Collar de cuentas», una configuración extendida de nucleosomas formado por la asociación de DNA con cuatro tipos de histonas. (**b**) La fibra de cromatina de 30 nm, representada aquí como una agrupación de nucleosomas estrechamente empaquetados. La quinta histona, H1, podría localizarse en el interior de la fibra. (**c**) Dominios en forma de bucle de fibras de 30 nm visibles aquí a MET ya que un cromosoma mitótico se ha desenrollado experimentalmente. (**d**) Heterocromatina, cromatina altamente plegada que es visible como puntos diferenciados incluso en células en interfase. (**e**) Un cromosoma replicado (dos cromátidas unidas) de una célula en división, con todo el DNA del cromosoma en forma de heterocromatina altamente compactada.

nes de cromatina en las que se han retirado las moléculas de H1, sugiriendo que la histona H1 facilita el empaquetamiento de los nucleosomas en fibras de 30 nm. Se han propuesto varios modelos para explicar cómo los nucleosomas individuales se empaquetan para formar una fibra de 30 nm. La mayoría de los primeros modelos proponían que la cadena de nucleosomas giraba sobre sí misma para formar algún tipo de estructura enrollada. Sin embargo, estudios recientes sugieren que la estructura de la fibra de 30 nm es mucho menos uniforme de lo que sugiere el modelo de enrollamiento. En vez de esto, parece que los nucleosomas de la fibra de 30 nm se empaquetaban de manera que formaban una estructura tridimensional, irregular, en forma de zigzag que puede interdigitarse con sus fibras vecinas.

El siguiente nivel de empaquetamiento de la cromatina es el plegamiento de las fibras de 30 nm en **dominios con bucles** que tienen aproximadamente entre 50.000 y 100.000 pb de longitud. Esta disposición en bucles se mantiene por el acoplamiento periódico del DNA a una red insoluble de proteínas no histónicas, que forman un *andamiaje* proteico al cual se unen los bucles más largos del DNA. Los dominios con bucles se ven con mayor claridad en micrografías electrónicas de cromosomas de células en división aislados que se han tratado para eliminar todas las histonas y la mayoría de las proteínas no histónicas (Figura 18.22). Los bucles también se observan en cromosomas especializados no asociados con el proceso de la división celular (*véase* la discusión sobre los cromosomas politénicos del Capítulo 23). En estos casos, los bucles de cromatina contienen regiones «activas» de DNA —es decir, DNA que se está transcribiendo—. Es lógico que el DNA activo esté empaquetado de manera más compacta que el DNA inactivo debido a que así se le facilitaría el acceso a las proteínas implicadas en la transcripción génica.

Incluso en las células en las que los genes se están transcribiendo de manera activa, cantidades significativas de cromatina pueden estar muy compactadas (Figura 18.21d). El grado de plegamiento en estas células varía de forma continua. Los segmentos de cromatina compactados fuertemente que aparecen como puntos oscuros en las micrografías se denomina **heterocromatina**, mientras que la forma de cromatina más difusa y menos empaquetada se denomina **eucromatina** (*véase* Figura 18.26a). La heterocromatina más empaquetada densamente contiene DNA que es inactivo transcripcionalmente, mientras que la eucromatina empaquetada más laxamente se asocia con DNA que está siendo transcrito activamente. La mayoría de la cromatina en las células activas metabólicamente están empaquetadas laxamente, en forma de eucromatina, pero a medida que la célula se prepara para dividirse, toda esa cromatina se vuelve muy compacta, generando un grupo de cromosomas distinguibles al microscopio. Debido a que el DNA del cromosoma se ha duplicado recientemente, cada cromosoma se compone de dos unidades duplicadas denominadas *cromátidas* (Figura 18.21e).

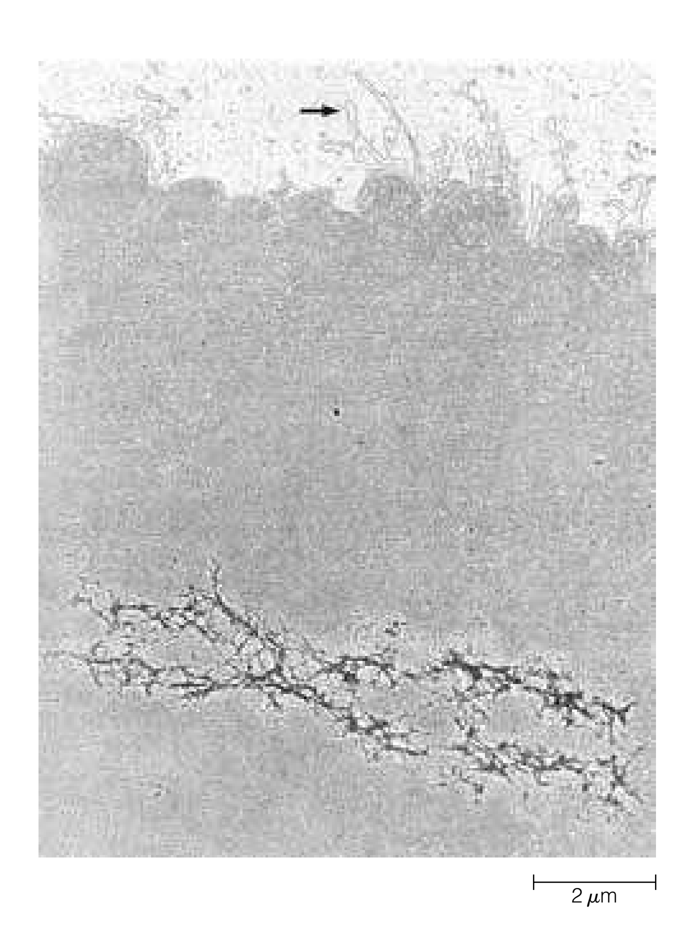


Figura 18.22 Micrografía electrónica que muestra el armazón proteico que queda tras eliminar las histonas de los cromosomas humanos. El DNA cromosómico se mantiene unido al armazón como una serie de bucles largos. La flecha señala una región donde puede verse claramente un bucle de la molécula de DNA (MET).

Usando el índice de empaquetamiento del DNA se puede cuantificar la medida en la que se pliega una molécula de DNA en la cromatina y en los cromosomas. Este índice determina la longitud total de una molécula de DNA extendida dividida por la longitud de la fibra de cromatina o del cromosoma en el que se ha empaquetado. El enrollamiento inicial del DNA alrededor de los núcleos de histona de los nucleosomas reduce la longitud por un factor de aproximadamente siete, y la formación de la fibra de 30 nm tiene como resultado una condensación de seis veces más. El índice de empaquetamiento de la fibra de 30 nm es por tanto de aproximadamente $7 \times 6 = 42$. Un plegamiento y un enrollamiento posterior proporcionan el índice de empaquetamiento total de la eucromatina típica en aproximadamente 750. Para la heterocromatina y para los cromosomas de las células en división, el índice de empaquetamiento es todavía superior. Por ejemplo, en el momento de la división celular, un cromosoma humano típico mide alrededor de 4-5 mm de longitud pero contiene una molécula de DNA que podría medir casi 75 mm si se extendiera por completo. El índice de empaquetamiento para un cromosoma de este tipo cae en el rango de 15.000 a 20.000.

Los eucariotas también empaquetan algo de su DNA en mitocondrias y cloroplastos

No todo el DNA de una célula eucariota está incluido en el núcleo. Aunque el DNA nuclear contiene la mayor parte de la información genética de la célula, las mitocondrias y los cloroplastos también contienen algo de DNA, junto a la maquinaria necesaria para replicar, transcribir y traducir la información codificada por éste. Las moléculas de DNA que residen en las mitocondrias y en los cloroplastos están desprovistas de histonas y normalmente son circulares (Figura 18.23). En otras palabras, se parecen al genoma de las bacterias, como se esperaría del probable origen endosimbiótico de estos orgánulos (tratado en el Cuadro de Texto 11A). Los genomas de las mitocondrias y los cloroplastos tienden a ser relativamente pequeños, comparables en tamaño a un genoma viral. Además, ambos orgánulos son semi-autónomos, capaces de codificar algunos polipéptidos, pero dependen del genoma nuclear para codificar la mayoría de ellos.

Por ejemplo, el genoma de las mitocondrias humanas consiste en una molécula de DNA circular que contiene 16.569 pares de bases y mide cerca de 5 mm de longitud. Se ha secuenciado completamente, y se conocen sus 37 genes. El RNA y los polipéptidos codificados por este DNA son sólo una pequeña fracción (de aproximadamente el 5%) del número de moléculas de RNA y proteínas necesarias para la mitocondria. Sin embargo, ésta es una contribución genética vital, entre cuyos productos se incluyen las moléculas de RNA presentes en los ribosomas mitocondriales, todas las moléculas del RNA de transferencia necesarias para la síntesis proteica mitocondrial, y 13 de las subunidades polipeptídicas del sistema de transporte de electrones. Esto incluye subunidades de NADH deshidrogenasa, citocromo *b*, citocromo *c* oxidasa y ATP sintasa (Figura 18.24).

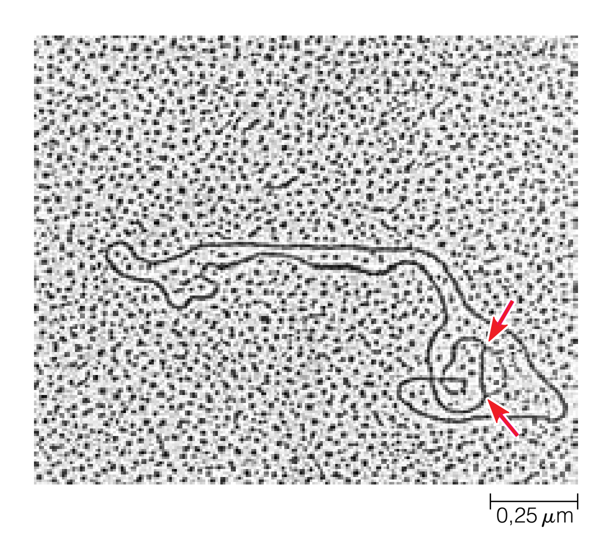


Figura 18.23 DNA mitocondrial. El DNA mitocondrial de la mayoría de los organismos es circular, como se ve en esta micrografía electrónica. Esta molécula fue fijada durante el proceso de replicación. Las flechas indican los puntos en los que se estaba desarrollando la replicación cuando se fijó la molécula para Microscopía Electrónica (MET).

El tamaño del genoma mitocondrial varía considerablemente entre organismos. Generalmente, las mitocondrias de los mamíferos tienen alrededor de 16.500 pb de DNA, mientras que el DNA de las mitocondrias de la levadura es aproximadamente cinco veces mayor y el DNA mitocondrial de plantas es incluso mayor que eso. Sin embargo, no está claro que los genomas mitocondriales más grandes codifiquen necesariamente para un número de polipéptidos

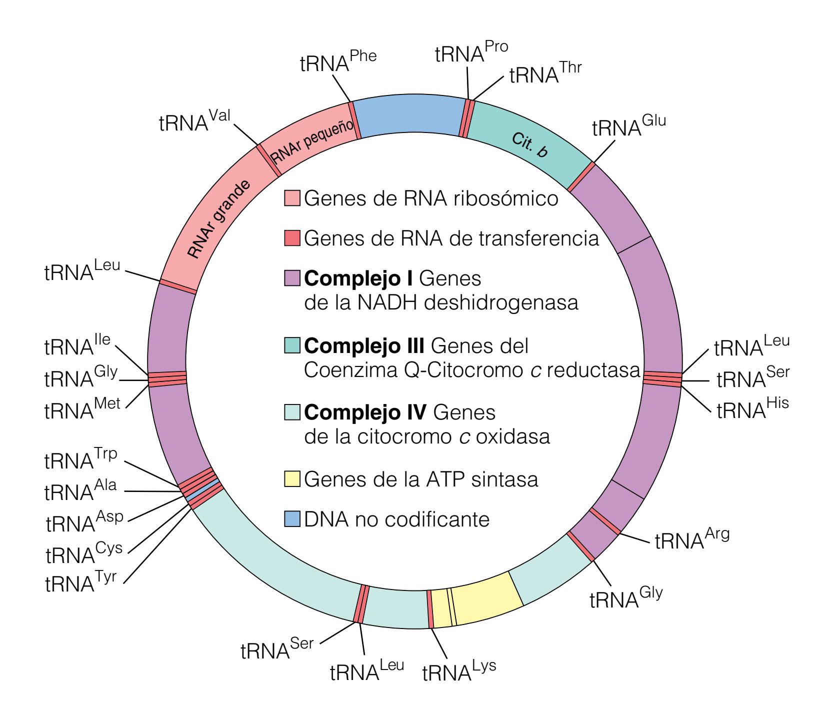


Figura 18.24 El genoma de la mitocondria humana. La molécula de DNA de doble cadena de la mitocondria humana es circular y contiene 16.569 pares de bases. Este genoma codifica para moléculas de RNA ribosomal grandes y pequeñas, para moléculas de RNA de transferencia (RNAt) (cada uno identificado con una abreviatura de tres letras que corresponde al aminoácido que transporta), y subunidades de varias de las proteínas que componen los complejos del sistema de transporte de electrones mitocondriales. Los genes de los RNAt son muy cortos porque las moléculas de RNA que codifican contienen sólo alrededor de 75 nucleótidos. Obsérvese que hay dos genes de RNAt para la leucina y dos para la serina; éstos codifican versiones ligeramente diferentes de RNAt para esos aminoácidos. El genoma mitocondrial es extremadamente compacto y con poco DNA no codificante entre los genes.

equivalente a esa longitud. Por ejemplo, la comparación del DNA mitocondrial de la levadura y humanos, sugiere que la mayoría del DNA adicional presente en la mitocondria de la levadura consiste en secuencias no codificadoras.

Normalmente, los cloroplastos poseen moléculas de DNA circular de aproximadamente 120.000 bp de longitud que contiene unos 120 genes. Además del RNA ribosómico y de transferencia y de los polipéptidos implicados en la síntesis de proteínas, el genoma del cloroplasto también codifica para un número de polipéptidos implicados de manera específica en la fotosíntesis. Éstas incluyen varios componentes polipeptídicos de los fotosistemas I y II y una de las dos subunidades de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa, la enzima que fija carbono en el ciclo de Calvin.

Curiosamente, la mayoría de los polipéptidos codificados por los genomas mitocondriales o por los genomas cloroplásticos son componentes de proteínas multiméricas que también contienen subunidades codificadas por el genoma nuclear. En otras palabras, las proteínas de los orgánulos que contienen subunidades codificadas de éste son normalmente complejos proteicos híbridos que contienen polipéptidos codificados y sintetizados dentro del orgánulo y polipéptidos codificados por el genoma nuclear y que se sintetizan por ribosomas citoplásmicos. Esto plantea cuestiones intrigantes sobre cómo entran en el orgánulo los polipéptidos sintetizados en el citoplasma, un tema sobre el que volveremos en el Capítulo 22.

El núcleo

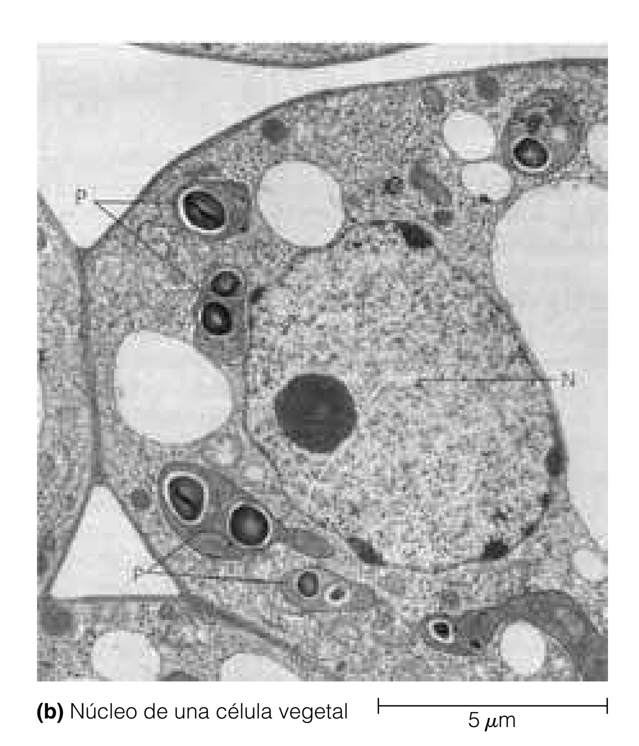
Hasta el momento, en este capítulo hemos tratado al DNA como el material genético de la célula, al genoma como a un juego completo de instrucciones de DNA para las células de una especie en particular, y al cromosoma como la manera física de empaquetar el DNA dentro de las células. Ahora llegamos al **núcleo**, el lugar dentro de la célula eucariota donde se localizan y se replican los cromosomas y donde se transcribe el DNA que contienen. Además, el núcleo es, tanto el almacén de la mayoría de la información genética de la célula, como el centro de control para la expresión de esa información.

El núcleo es uno de los rasgos más prominentes y característicos de las células eucariotas (Figura 18.25). Recuerde que el término *eukaryon* significa «núcleo verdadero». La verdadera esencia de una célula eucariota es su núcleo rodeado de membrana, que compartimentaliza las actividades del genoma —tanto la replicación como la transcripción— del resto del metabolismo celular. En la siguiente discusión, primero nos centraremos en la envuelta membranosa que forma los límites del núcleo. Después, desviaremos nuestra atención hacia los poros que perforan la envuelta, hacia la matriz estructural del interior del núcleo, hacia la distribución de la cromatina y finalmente hacia la organización del nucleolo. La Figura 18.26 proporciona una visión general de algunas de estas estructuras nucleares.

SG

SG

(a) Núcleo de una célula animal 5 μm



(b) Núcleo de una célula vegetal 5 μm

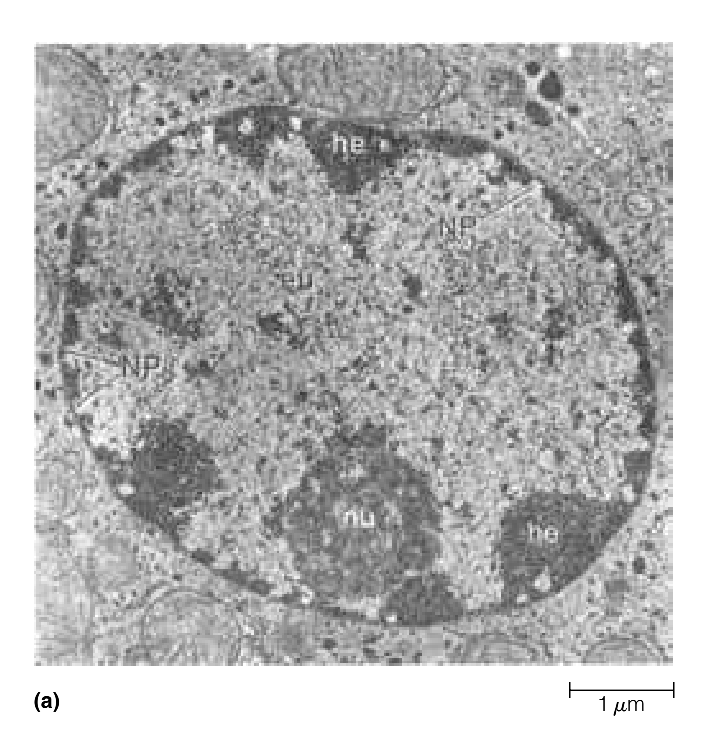
Figura 18.25 El núcleo. El núcleo es una característica estructural prominente en la mayoría de las células eucarióticas. (**a**) Núcleo (N) de una célula animal. Esta es una célula productora de insulina del páncreas de rata; de ahí la prominencia de los gránulos de secreción (SG) en el citoplasma. (**b**) Núcleo (N) de una célula vegetal. Ésta es una célula de un nódulo de raíz de soja. La prominencia de plástidos (P) refleja su papel en el almacenamiento de gránulos de almidón (METs).

El núcleo está rodeado por una envuelta nuclear de doble membrana

La existencia de una membrana alrededor del núcleo se sugirió por primera vez a finales del siglo XIX. Antes de la llegada del microscopio electrónico se conocía poco sobre la estructura de este límite membranoso ya que la microscopía óptica lo mostraba solamente como un límite borroso en la superficie externa del núcleo. La microscopía electrónica de transmisión reveló que el núcleo estaba rodeado por una **envuelta nuclear** compuesta por dos membranas —la membrana nuclear interna y externa— separadas por el **espacio perinuclear** que mide alrededor de 20-40 nm de un extremo a otro (*véase* Figura 18.26b). Cada membrana tiene entre 7 y 8 nm de espesor y muestra la misma apariencia trilaminar que muestran la mayoría de las otras membranas celulares. La membrana nuclear interna se apoya sobre una red de fibras de soporte denominadas *lámina nuclear* (de la que se tratará más tarde en este capítulo). La membrana nuclear externa continúa con el retículo endoplasmático proporcionando continuidad entre el espacio perinuclear y el lumen del RE. Al igual que las membranas del RE rugoso, la membrana externa está con frecuencia cubierta de ribosomas implicados en la síntesis de proteínas. En algunas células, los filamentos intermedios del citoesqueleto celular se extienden desde la membrana externa hacia el citoplasma, anclando el núcleo a otros orgánulos o a la membrana plasmática.

Una de las características más distintivas de la envuelta nuclear es la presencia de aperturas especializadas, denominadas los **poros nucleares**, que son especialmente fáciles de observar cuando se examina la envuelta nuclear por criofractura (Figura 18.27). Cada poro es un canal cilíndrico pequeño que se extiende a través de ambas membranas de la envuelta nuclear, proporcionando así continuidad entre el citosol y el **nucleoplasma**, el espacio interior del núcleo (aparte de la región del nucleolo). La densidad de poros (es decir, número por unidad de área de envuelta nuclear) varía de forma importante con el tipo de célula y la actividad. Un núcleo de mamíferos típico, tiene entre 3.000 y 4.000 poros, o entre 10 y 20 poros por micra cuadrada.

En cada poro, las membranas interna y externa de la envuelta nuclear se fusionan, formando un canal que está alineado con una estructura proteica intrincada denomi-



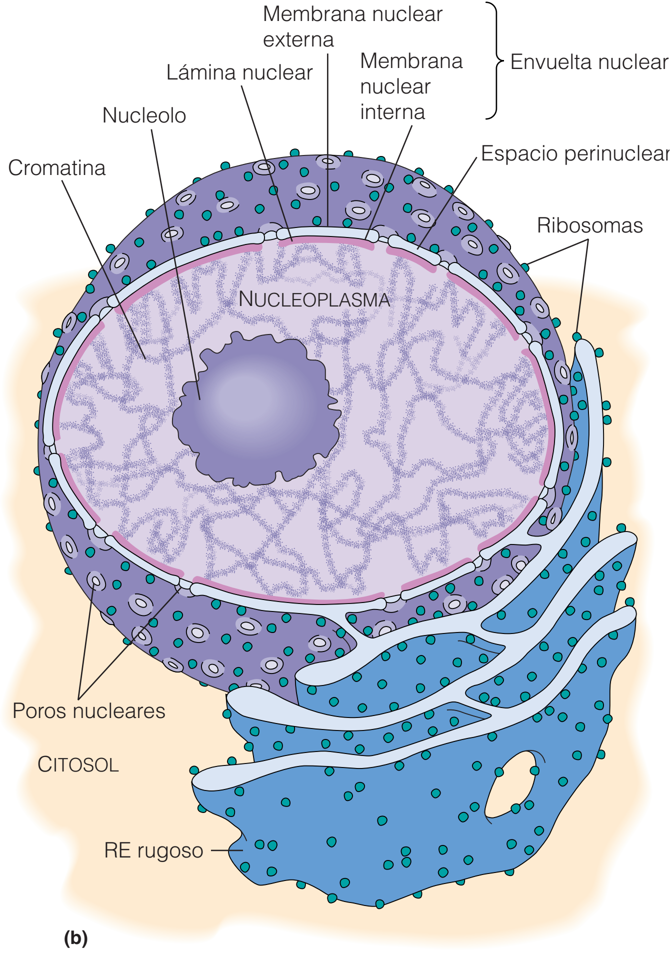


Figura 18.26 Organización estructural del núcleo y de la envuelta nuclear. (**a**) Micrografía electrónica del núcleo de una célula hepática de ratón con las características estructurales prominentes marcadas (MET). La envuelta nuclear consiste en una doble membrana perforada por poros nucleares (NP). Las estructuras internas incluyen el nucleolo (nu), eucromatina (eu) y heterocromatuna (he). (**b**) Dibujo de un núcleo típico. Las características estructurales incluidas aquí pero no visibles en la micrografía incluyen la lámina nuclear, los ribosomas en la membrana nuclear externa y la continuidad entre la membrana nuclear externa y el RE rugoso.

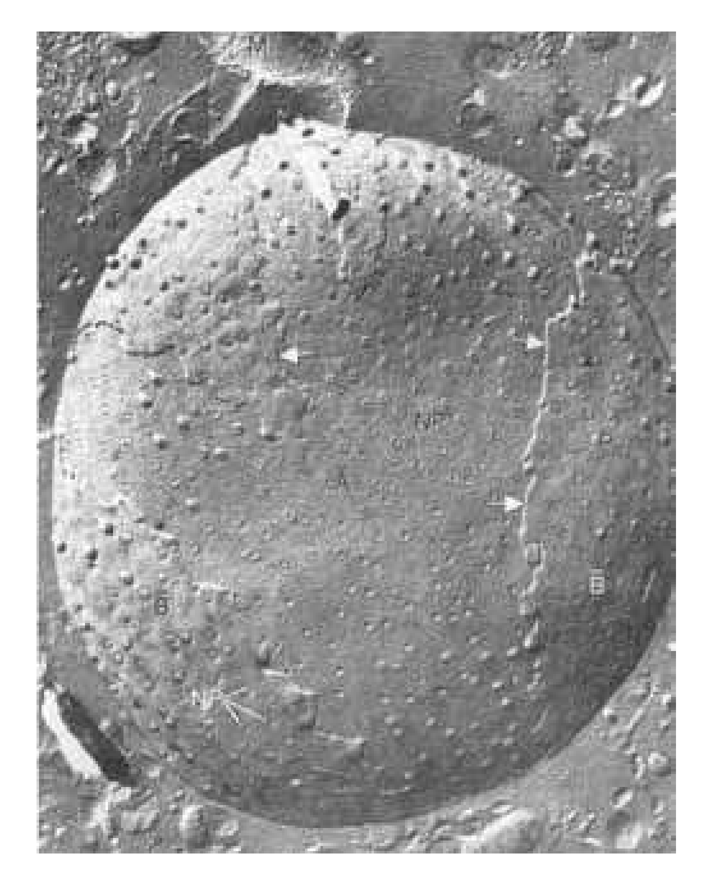
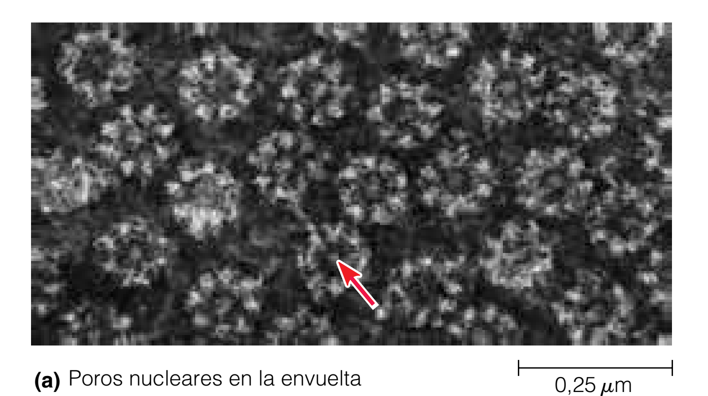


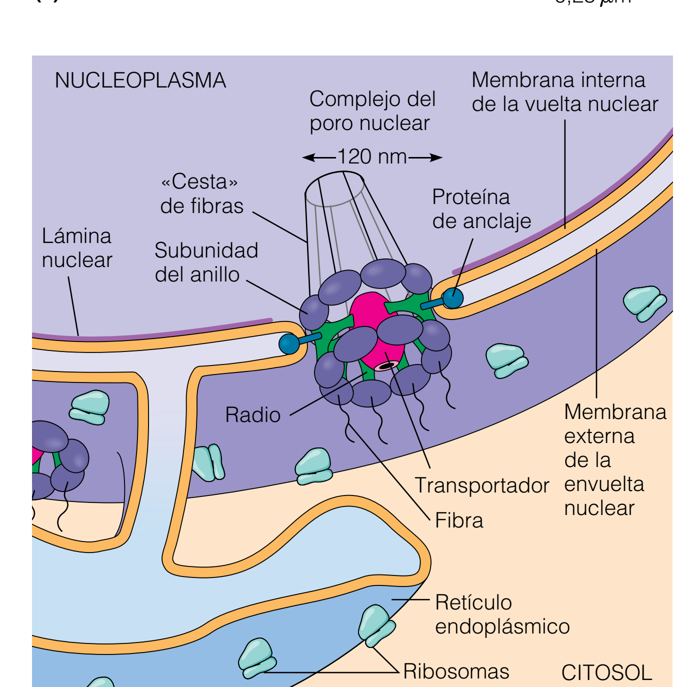
Figura 18.27 Poros nucleares. En esta micrografía de criofractura de la envuelta nuclear de una célula epitelial del riñón de rata se ven numerosos poros nucleares (NP). El plano de fractura revela caras tanto de la membrana interna (A) como de la membrana externa (B). Los bordes que señalan las flechas representan el espacio perinuclear delimitado por las dos membranas (MET).

nada el **complejo del poro nuclear (CPN)**. El diámetro del complejo de poro en su conjunto es de unos 120 nm. Tiene una masa global de unos 120 millones de daltons y consta de docenas de clases diferentes de subunidades polipeptídicas. En las micrografías electrónicas, la característica más llamativa del complejo de poro es la disposición octogonal de sus subunidades. Las micrografías, como las de la Figura 18.28a, muestran anillos de ocho subunidades dispuestas siguiendo un patrón octogonal. En otras vistas, se observa que las ocho subunidades sobresalen tanto por el lado citoplásmico como nucleoplásmico de la envuelta. Fíjese en que se observan gránulos centrales en algunos de los complejos de poro nuclear de la Figura 18.28a. Aunque hubo un tiempo en el que se pensó que estos gránulos eran partículas en tránsito a través de los poros, las evidencias recientes sugieren que son parte integrante del complejo de poro. Aparentemente se pierden con facilidad durante el procesamiento de las muestras para microscopía.

La Figura 18.28b ilustra los principales componentes del complejo de poro nuclear. El examen de este diagrama revela que el complejo de poro en su conjunto tiene forma de rueda puesta de lado en la envuelta nuclear. Dos anillos



(a) Poros nucleares en la envuelta



(b) Localización de los poros nucleares en la membrana nuclear

Figura 18.28 Estructura del poro nuclear. (**a**) La tinción negativa de una envuelta nuclear de un oocito revela el patrón octogonal de los complejos de los poros nucleares. La flecha señala un gránulo central. Esta envuelta nuclear procede de un oocito del tritón *Taricha granulosa* (MET). (**b**) Un poro nuclear se forma por la fusión de las membranas nucleares interna y externa y está contorneado por una intrincada estructura proteica denominada complejo del poro nuclear. La estructura tiene aproximadamente forma de rueda y simetría octogonal. Dos anillos paralelos formados cada uno por ocho subunidades (morado oscuro) delimitan el borde de la rueda. Ocho radios (verde) conectan los dos anillos (dos de los radios se han omitido en el dibujo) y se extienden hacia el transportador central (rosa oscuro) en el eje de la rueda; el transportador podría ser una estructura similar a un diafragma que se abre y se cierra para permitir el paso de partículas de diferentes tamaños. Las proteínas que se extienden desde el ensamblaje del borde y los radios hacia el espacio perinuclear probablemente ayudan a fijar el complejo a la envuelta nuclear. Hay fibras que se extienden por encima y por debajo del complejo formando las del lado nucleoplásmico una cesta de función desconocida. El complejo del poro nuclear podría consistir hasta de cien polipéptidos diferentes.

paralelos perfilan el borde de la rueda, cada uno consta de las ocho subunidades que se veían en las micrografías electrónicas. Ocho radios (en verde) se extienden desde los anillos hacia el centro de la rueda (rosa oscuro), que forman el gránulo central que se observaba en las micrografías electrónicas. A este gránulo se le denomina normalmente transportador ya que se piensa que mueve macromoléculas a través de la envuelta nuclear. Se cree que las proteínas que se extienden desde el borde hacia el espacio perinuclear ayudan a anclar el complejo de poro a la envuelta. Además, las fibras se extienden desde los anillos hacia el citosol y hacia el nucleoplasma, las que están del lado del nucleoplasma forman una cesta (a la que a veces se denomina «jaula» o «red»).

Las moléculas entran y salen del núcleo a través de los poros nucleares

La envuelta nuclear es tanto la solución de un problema como la fuente de otro. Es una manera de localizar los cromosomas en una parte de la célula, y es un ejemplo de la estrategia general eucariota de compartimentalización. Presumiblemente, para el núcleo es ventajoso poseer una barrera para mantener en el interior a los cromosomas y para dejar fuera a orgánulos como ribosomas, mitocondrias, lisosomas y microtúbulos. Por ejemplo, la envuelta nuclear protege a los RNAs recién sintetizados de la actuación de los orgánulos citoplasmáticos y de las enzimas antes de que se haya procesado por completo.

Al mismo tiempo que protege a los cromosomas y a las moléculas de RNA inmaduro de la exposición al citoplasma, la envuelta nuclear crea en las células eucariotas problemas formidables de transporte, desconocidos para los procariotas. Todas las enzimas y otras proteínas requeridas para la replicación y transcripción del DNA en el núcleo, se deben importar desde el citoplasma, y todas las moléculas de RNA y los ribosomas parcialmente ensamblados que se necesitan para la síntesis proteica en el citoplasma se deben obtener del núcleo (Figura 18.29). En respuesta a estos problemas de transporte, se han desarrollado unos poros

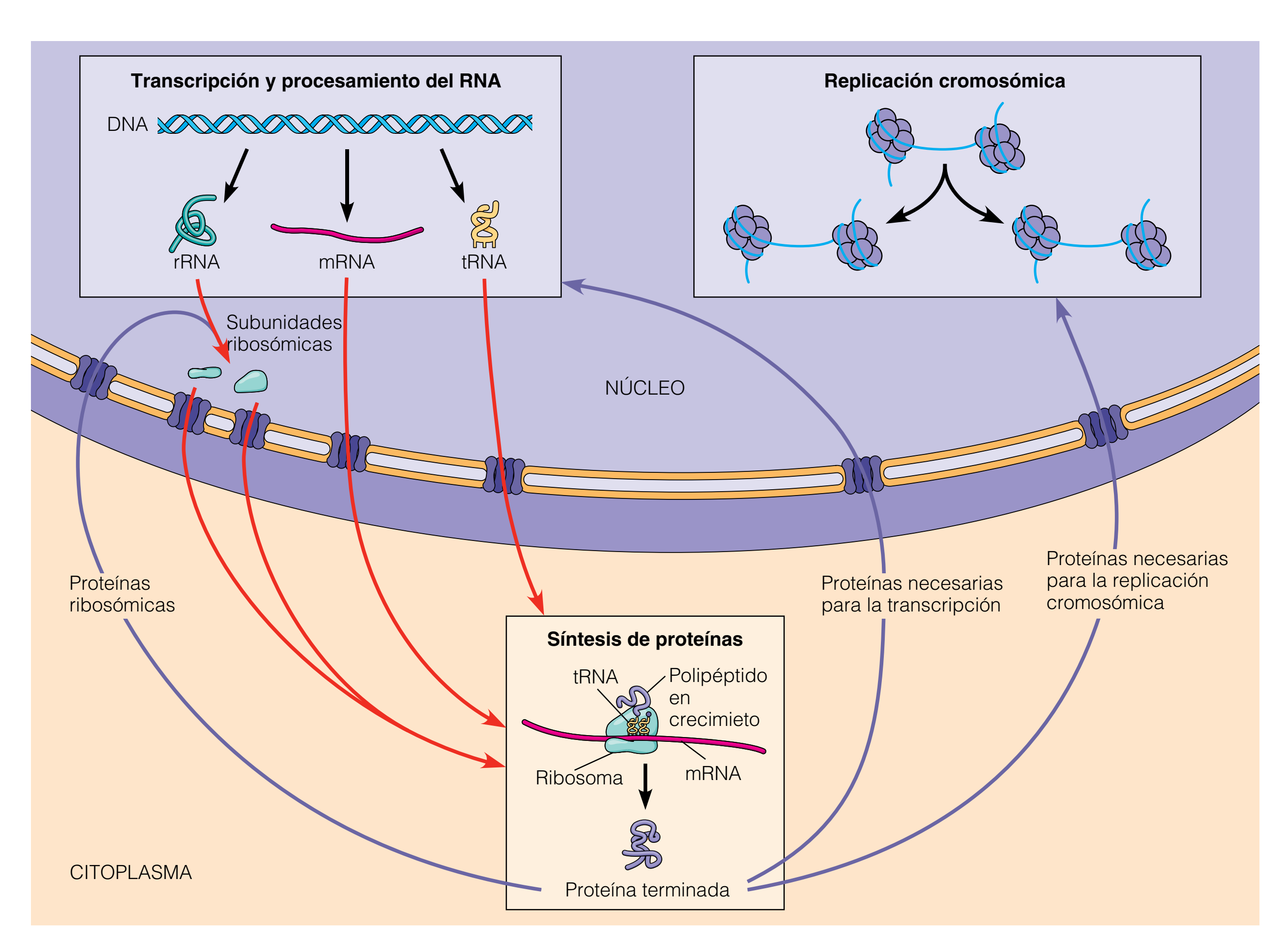


Figura 18.29 Transporte macromolecular hacia y desde el núcleo. Dado que las células eucarióticas almacenan su información genética en el núcleo pero sintetizan proteínas en el citoplasma, todas las proteínas que se necesitan en el núcleo deben ser transportadas hacia el interior desde el citoplasma (flechas moradas), y todas las moléculas de RNA y subunidades ribosómicas necesarias para la síntesis de proteínas en el citoplasma deben ser transportadas hacia el exterior desde el núcleo (flechas rojas). Las tres clases de moléculas de RNAr que se requieren para la síntesis de proteínas son el RNA ribosómico (RNAr), el RNA mensajero (RNAm) y el RNA de transferencia (RNAt).

especializados que, prácticamente, median todo el transporte al interior y al exterior del núcleo.

Para hacernos una idea de cuánto tráfico viaja a través de los poros nucleares, consideraremos el flujo de las subunidades ribosomales desde el núcleo al citoplasma. Los ribosomas están parcialmente ensamblados en el núcleo como dos clases de subunidades, cada una de las cuales es un complejo de RNA y proteínas. Estas subunidades se mueven hacia el citoplasma y cuando se necesitan para sintetizar proteínas, se combinan en ribosomas funcionales que contienen una subunidad de cada tipo. Una célula de mamífero en crecimiento activo puede sintetizar fácilmente unas 20.000 subunidades ribosomales por minuto. Ya sabemos que una célula de este tipo tiene de unos 3.000 a 4.000 poros nucleares, de manera que las subunidades ribosomales se transportan hacia el citoplasma a una velocidad de aproximadamente 5-6 subunidades por minuto y por poro. El tráfico en la dirección opuesta es, si acaso, más denso. Cuando los cromosomas se están replicando, se necesitan histonas a una velocidad de 300.000 moléculas por minuto. La velocidad del movimiento hacia el interior debe ser además de ¡unas 100 moléculas de histona por minuto y por poro! Además de todo este tráfico macromolecular, los poros también median el transporte de partículas más pequeñas, moléculas e iones.

Difusión simple de pequeñas moléculas a través de los poros nucleares. La idea de que las moléculas pequeñas pueden difundir libremente en ambos sentidos a través de los poros nucleares recibió apoyo experimental, por primera vez, a partir de estudios en los que se inyectaron partículas de oro coloidal de varios tamaños en el citoplasma de células, que después, se examinaron al microscopio electrónico. Poco después de la inyección, se podía ver a las partículas de oro pasando a través de los poros nucleares hacia el núcleo. La velocidad de entrada de las partículas en el núcleo está inversamente relacionada con el diámetro de la partícula —es decir, cuanto más grande es la partícula de oro, más lentamente entra en el núcleo—. Las partículas mayores de 10 nm de diámetro se excluyen por completo. Puesto que el diámetro total de un complejo del poro nuclear es mayor que el de las partículas de oro, se concluyó que los complejos de poro contienen pequeños *canales de difusión acuosos* a través de los que se mueven libremente las partículas y moléculas pequeñas.

Para determinar el diámetro de estos canales, los investigadores inyectaron proteínas radiactivas de varios tamaños en el citoplasma de las células y observaron cuánto tiempo le cuesta a dichas proteínas aparecer en el núcleo. A una proteína globular con un peso molecular de 20.000 le cuesta sólo unos minutos equilibrarse entre el citoplasma y el núcleo, pero la mayoría de las proteínas de 60.000 daltons o más no son casi capaces de penetrar en el núcleo. Éstas y otras medidas de transporte indican que los canales de difusión acuosos tienen unos 9 nm de diámetro, un tamaño que crea una barrera de permeabilidad para moléculas con un peso molecular significativamente mayor de 20.000. Hasta hace poco, los investigadores generalmente asumían que cada complejo de poro nuclear tenía uno solo de esos canales. Sin embargo, ahora parece que pueden ser 8 canales, separados 9 nm y localizados en la periferia del poro nuclear, entre los radios, y quizás un canal adicional en el centro del transportador. Se piensa que estos canales acuosos son permeables al libre paso de moléculas pequeñas e iones (incluyendo proteínas pequeñas) debido a que estas sustancias atraviesan la envuelta nuclear rápidamente después de ser inyectadas en las células. Además, los nucleósidos trifosfato necesarios para la síntesis de DNA y RNA probablemente difunden libremente a través de los poros, como lo hacen otras moléculas pequeñas necesarias para las rutas metabólicas que funcionan en el núcleo.

Transporte activo de grandes proteínas y de RNA a través de los poros nucleares. Muchas de las proteínas implicadas en el empaquetamiento, replicación y transcripción del DNA son lo suficientemente pequeñas como para pasar a través de un canal de 9 nm de ancho. Las histonas, por ejemplo, tienen pesos moleculares de 21.000 o menos y deberían difundir pasivamente a través de los poros nucleares sin problemas. Sin embargo, algunas proteínas nucleares son muy grandes. Las enzimas implicadas en la síntesis de DNA y de RNA, por ejemplo, tienen subunidades con pesos moleculares que exceden de los 100.000, que es demasiado grande para pasar a través de una apertura de 9 nm. Las moléculas de RNA mensajero también suponen un reto, ya que abandonan el núcleo unidas a proteínas, en forma de complejos RNA-proteína («ribonucleoproteína») que son bastante grandes. Las subunidades ribosomales también se deben exportar hacia el citoplasma después de haber sido ensambladas en el núcleo. Claramente, el transporte de todas estas partículas a través de los poros nucleares es un reto significativo.

Un buen grupo de evidencias sugieren que moléculas y partículas tan grandes, son transportadas activamente a través de los poros nucleares, por un proceso selectivo. Como el transporte activo a través de las membranas normales, el transporte activo a través de los poros nucleares requiere energía e implica la unión específica de las sustancias transportadas a proteínas de membrana, que en este caso forman parte del complejo de poro. El mecanismo molecular subyacente se entiende mejor en el caso de proteínas que se transportan activamente desde el citosol hacia el núcleo. Tales proteínas poseen una o más **señales de localización nuclear (SLN)**, que son secuencias de aminoácidos que permiten que la proteína sea reconocida y transportada por el complejo de poro nuclear. Una SLN tiene normalmente una longitud de 8 a 30 aminoácidos y a menudo contiene prolina, así como aminoácidos (básicos) cargados positivamente, como lisina y arginina.

El papel que desempeñan las secuencias SLN en el direccionamiento de proteínas hacia el núcleo se ha esta-

blecido gracias a experimentos en donde partículas de oro de más de 9 nm de diámetro —demasiado grandes como para atravesar los canales de difusión acuosos de los poros nucleares— se cubrieron con polipéptidos que contenían SLN y se inyectaban en el citoplasma de ovocitos de ranas. Después de este tratamiento, las partículas de oro de hasta 26 nm de diámetro se transportaban rápidamente a través de los complejos de poro nuclear hacia el núcleo. Además, el diámetro máximo para el transporte *activo* a través de la envuelta nuclear parece ser 26 nm (frente a 9 nm para la difusión simple). Éste es sólo uno de los numerosos ejemplos en los que se ha encontrado que una secuencia corta de aminoácidos dirige a una molécula o a una partícula a un sitio celular específico.

El proceso para transportar proteínas citoplásmicas hacia el núcleo a través de los poros nucleares se ilustra en la Figura 18.30a. En el paso ①, una proteína citoplásmica que contiene una SLN es reconocida por un tipo de proteína

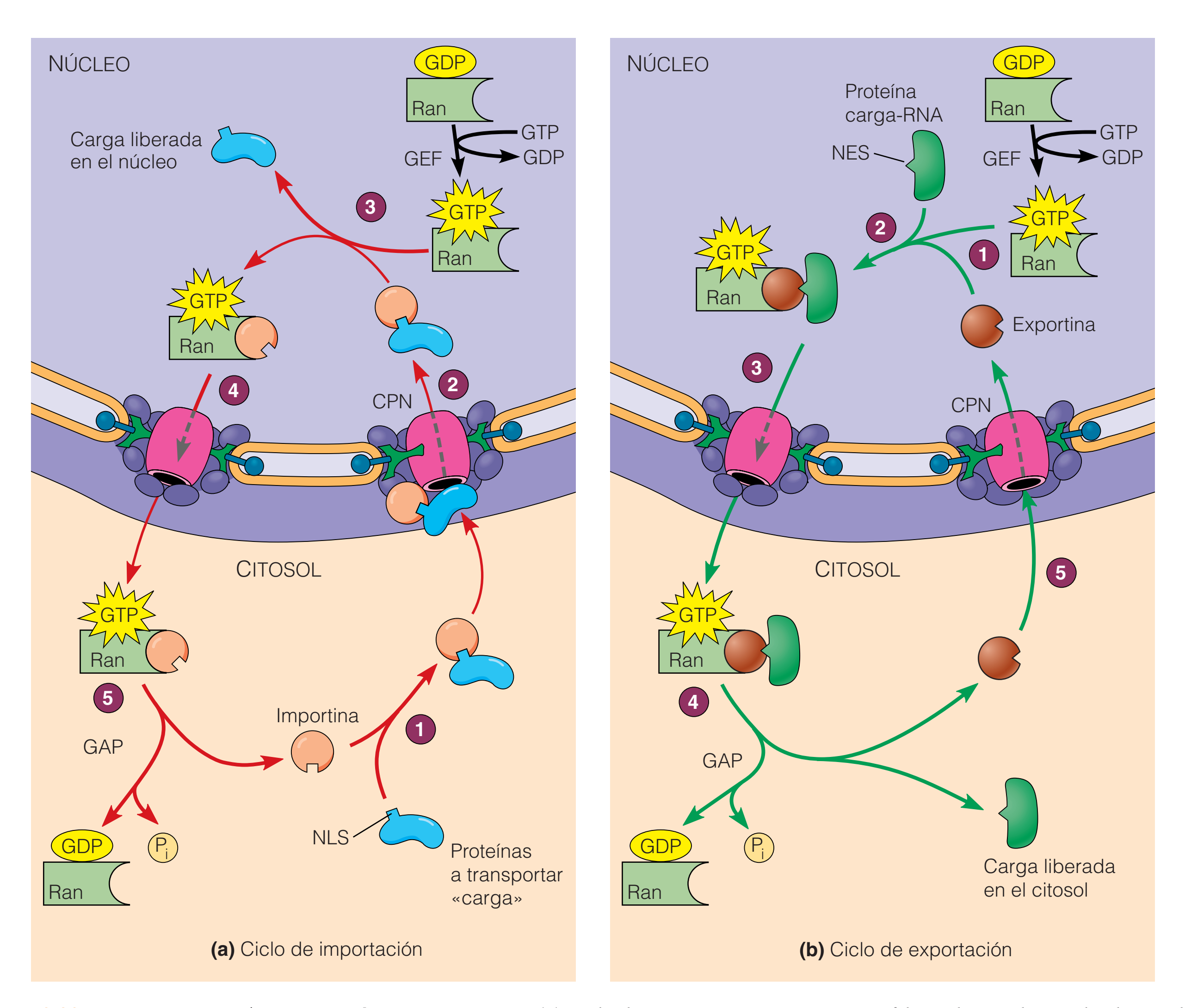


Figura 18.30 **Transporte a través del complejo de poro nuclear.** (**a**) Ciclo de importación. Las proteínas fabricadas en el citosol y destinadas para su uso en el núcleo contienen una secuencia de localización nuclear (SLN) que las marca como «carga» a transportar a través del complejo de poro nuclear. ① Una proteína a transportar que contiene la secuencia SLN se une a importina y ② el complejo proteína a transportar-importina se transporta a través del complejo de poro nuclear. ③ Ran-GTP nuclear se une a la importina desencadenando la liberación de la proteína a transportar en el núcleo. ④ El complejo Ran-GTP-importina se transporta de vuelta hacia el citosol, donde ⑤ la hidrólisis de GTP a GDP se acompaña por la liberación de importina. (**b**) Ciclo de exportación. La principal carga de exportación nuclear es RNA en lugar de proteínas, pero los RNAs se transportan generalmente hacia el exterior del núcleo mediante proteínas que contienen una señal de exportación nuclear (SEN). Durante el ciclo de exportación, ① Ran-GTP se une a la exportina en el núcleo, lo que ② promueve la unión de la exportina a su carga, en este caso el complejo RNA-proteína. ③ El complejo exportina-carga-RNA-GTP se exporta a través de los poros nucleares hacia el citosol, donde ④, la exportina y su carga se liberan de Ran, acompañado por la hidrólisis de GTP a GDP. ⑤ La exportina vuelve entonces al núcleo, donde puede repetir el ciclo de exportación. Los ciclos de importación y exportación se impulsan por un gradiente de concentración de Ran-GTP que se mantiene por la presencia de un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF del inglés, Guanine-nucleotide Exchange Factor) en el núcleo y una proteína activadora de GTPasa (GAP del inglés, GTPase Activating Protein) en el citosol.

receptora denominada **importina**, que se une a la SLN y media el movimiento de la proteína que contiene la SLN hacia el poro nuclear, sirviendo las fibras citoplasmáticas del poro, quizás de alguna forma, como carriles. En el paso ②, el complejo proteico SLN-importina se transporta al núcleo por el transportador del centro del complejo de poro nuclear (CPN). Después de llegar al núcleo, la molécula de importina se asocia con la proteína *Ran* que se une a GTP. Esta interacción entre importina y Ran provoca que la proteína que contiene la SLN sea liberada para su uso en el núcleo (paso ③). El complejo Ran-GTP-importina se transporta de vuelta a través de un poro nuclear hacia el citoplasma (paso ④) donde la importina se libera para su reutilización, acompañada de la hidrólisis de Ran unido a GTP (paso ⑤). Las evidencias de que este paso de hidrólisis de GTP, produce la energía para la importación nuclear se obtienen a partir de experimentos que muestran que el transporte nuclear se puede inhibir exponiendo a las células a análogos de GTP no hidrolizables, pero no a análogos de ATP no hidrolizables.

Para la exportación de material al exterior del núcleo, operan mecanismos comparables. La principal diferencia es que el transporte hacia el exterior del núcleo se usa principalmente para las moléculas de RNA que se sintetizan en el núcleo pero que funcionan en el citoplasma, mientras que la importación nuclear está dedicada en gran parte, a importar proteínas que se sintetizan en el citoplasma pero funcionan en el núcleo. Aunque la carga principal a transportar en la exportación nuclear es RNA en lugar de que proteínas, la exportación de RNA está mediada por proteínas que se unen a RNA. Estas proteínas de adaptación contienen secuencias de aminoácidos denominadas señales de exportación nuclear (SEN), que dirigen a la proteína, y por extensión al RNA que lleva unido, para exportarlo a través de los poros nucleares. Las secuencias SEN se reconocen por proteínas receptoras del transporte nuclear denominadas **exportinas**, que se unen a moléculas que contienen secuencias SEN y median su transporte hacia el exterior, a través de poros nucleares, por un mecanismo que recuerda al modo en que las importinas transportan moléculas citoplasmáticas al núcleo (Figura 18.30b).

La diferencia en la dirección entre el transporte mediado por importinas y por exportinas, está guiado por la interacción entre Ran-GTP y estas dos clases de moléculas, acompañado por un gradiente de concentración de Ran-GTP a través de la envuelta nuclear. La concentración de Ran-GTP se mantiene elevada en el interior del núcleo gracias a un *factor intercambiador de nucleótidos de guanina, (GEF)*, [del inglés Guanine-nucleotide Exchange Factor] que promueve la unión de GTP a Ran a cambio de GDP. Por el contrario, el citosol contiene una *proteína activadora de GTPasa (GAP)* [del inglés GTPase activating protein] que promueve la hidrólisis de GTP por Ran, disminuyendo además la concentración de Ran-GTP fuera del núcleo. Las concentraciones relativamente elevadas de Ran-GTP en el núcleo tienen dos efectos: primero, la Ran-GTP nuclear *promueve la liberación* de la carga, que contiene SLN, de la importina (Figura 18.30a; paso ③); segundo, Ran-GTP nuclear *promueve la unión* de la carga que contiene SEN a la exportina (Figura 18.30b; paso ②). El resultado neto es que la dirección del transporte para cualquier molécula a transportar se determina por el tipo de secuencia de destino (SLN o SEN) que dicta si las importinas liberarán la molécula transportada en el núcleo y la unirán en el citoplasma, o las exportinas unirán la molécula a transportar en el núcleo y la liberarán en el citoplasma.

La matriz nuclear y la lámina nuclear son estructuras de soporte del núcleo

Entre el 80 y el 90% de la masa nuclear está constituida por fibras de cromatina, así que se podría esperar que retirar la cromatina causara que el núcleo se colapsara en una masa relativamente desestructurada. Sin embargo, a principios de los 70, los investigadores descubrieron que después de que más del 95% de la cromatina se hubiera retirado por una combinación de tratamientos con nucleasa y detergente permanecía una red fibrosa insoluble que retenía por completo la forma del núcleo. Se pensaba que esta red denominada, la **matriz nuclear** (o nucleoesqueleto), ayudaba a mantener la forma del núcleo y proporcionaba un esqueleto organizador para las fibras de cromatina. Sin embargo, la existencia de la matriz nuclear no ha sido aceptada por todos los biólogos celulares. Las fibras son sólo visibles en ciertas micrografías (Figura 18.31), llevando a los escépticos a cuestionarse si son artefactos introducidos durante el procesamiento de la muestra.

En los últimos años, evidencias adicionales han reforzado la idea de la existencia de una matriz estructural que organiza las actividades del núcleo. Por ejemplo, se sugiere una conexión estrecha entre la matriz y las fibras de cromatina debido al descubrimiento de que las preparaciones de matriz nuclear aisladas, siempre contienen pequeñas cantidades de DNA y RNA unidas estrechamente. Las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos han revelado que el DNA unido íntimamente es rico en secuencias que se transcriben de forma activa en RNA. Además, cuando se incuban las células con timidina-H^3, un precursor radiactivo para la síntesis de DNA, se observa que el DNA radiactivo recién sintetizado está asociado, de forma preferente, a la matriz nuclear. Estas observaciones sugieren que la matriz nuclear puede estar implicada en el anclaje de las fibras de cromatina a localizaciones donde el DNA o el RNA están siendo sintetizados, organizando de este modo al DNA para que se replique y se transcriba de forma ordenada y quizás incluso proporcionando carriles que guíen y propulsen al RNA mensajero recién formado hacia los poros nucleares para transportarlos al citoplasma.

Mientras que la naturaleza exacta y la significación funcional de la matriz nuclear se mantienen sin esclarecer, el

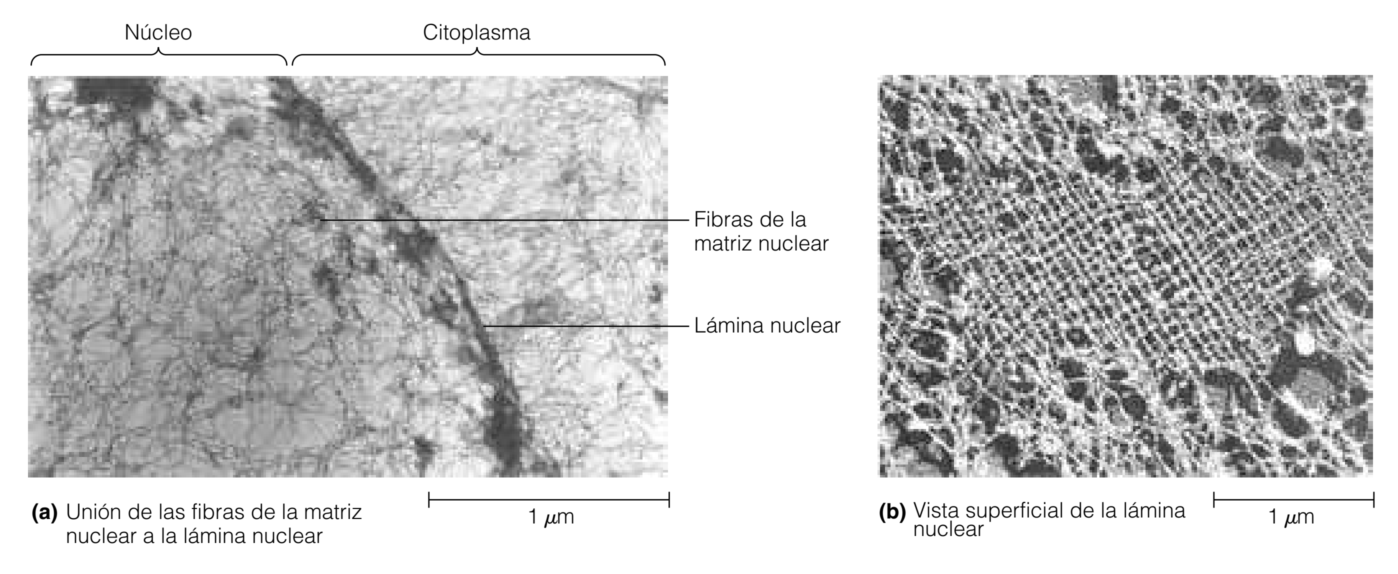


Figura 18.31 La matriz nuclear y la lámina nuclear. (**a**) Esta micrografía electrónica de una parte del núcleo de una célula de mamífero muestra una red ramificada de filamentos de la matriz nuclear atravesando el núcleo. Estos filamentos parecen estar pegados a la lámina nuclear, la densa capa de filamentos que limita el lado del nucleoplasmático de la envuelta nuclear. (**b**) Vista superficial de la lámina nuclear de un oocito de rana (METs).

núcleo contiene otra estructura fibrosa cuyo papel ha sido definido con mayor claridad. Esta estructura denominada la **lámina nuclear**, es una red de fibras densa y fina que limita la superficie interna de la membrana nuclear interna y que ayuda a sostener a la envuelta nuclear. La lámina nuclear tiene un espesor de entre 10 y 40 nm y está construida con filamentos intermedios fabricados con proteínas denominadas *láminas* (tratadas en mayor detalle en el Capítulo 15). Al menos algunos de estos filamentos parecen estar unidos a proteínas de la membrana nuclear interna. Además de proporcionar soporte estructural para la envuelta nuclear, la lámina nuclear puede también proporcionar lugares de anclaje para la cromatina, un tema al que nos referiremos en la siguiente sección.

Las fibras de cromatina no están dispersas al azar en el núcleo

Aparte del momento de la división celular, las fibras de cromatina de una célula tienden a estar muy extendidas y dispersas en el núcleo. Además, se podría suponer que las fibras de cromatina que corresponden a cada cromosoma individual se distribuyen al azar y están muy entrelazadas dentro del núcleo. Quizás, de forma sorprendente, este parece no ser el caso. En vez de eso, la cromatina de cada cromosoma aparentemente tiene su propia localización. Esta idea se propuso por primera vez en 1885, pero las evidencias de que es cierto en una gran variedad de células esperaban a las técnicas de la biología molecular moderna. Recientemente, utilizando sondas de ácidos nucleicos que se hibridan con el DNA de cromosomas específicos, varios grupos de investigación han demostrado que las fibras de cromatina correspondientes a los cromosomas individuales ocupan compartimentos diferenciados dentro del núcleo, referidos como «territorios cromosómicos» (Figura 18.32). Sin embargo, las posiciones de estos territorios no parecen ser fijas. Varían de célula a célula del mismo organismo y parecen cambiar durante el ciclo de vida de una célula, reflejando quizás cambios en la actividad de los genes de los diferentes cromosomas.

La envuelta nuclear ayuda a organizar la cromatina uniendo ciertos segmentos a sitios específicos de la super-

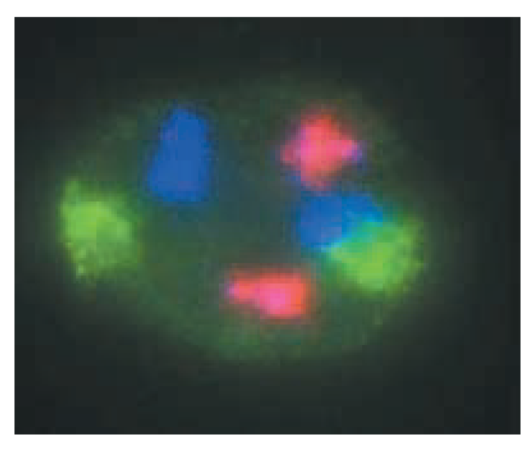


Figura 18.32 Territorios cromosómicos. Las células de pulmón de ratón se tiñen con colorantes fluorescentes ligados a sondas de ácidos nucleicos que hibridan específicamente con el DNA del cromosoma 12 (rojo), cromosoma 14 (verde) o cromosoma 15 (azul). Esta vista de un solo núcleo observado a microscopía óptica muestra que el DNA de cada cromosoma se localiza en una región específica del núcleo (cada cromosoma está presente en dos copias).

ficie interna de la envuelta, asociados estrechamente a los poros nucleares. Los segmentos de cromatina que se unen de esta forma están muy compactados —es decir, son heterocromatina—. En las micrografías electrónicas, este material aparece como una capa oscura irregular alrededor de la periferia nuclear, como se ve en la Figura 18.26a. La mayoría parece ser del tipo denominado **heterocromatina constitutiva**, que aparece en una forma altamente condensada, prácticamente todo el tiempo, en todas las células del organismo. El DNA de la heterocromatina constitutiva consiste en DNA repetido de secuencia simple (recuerde que éstas son secuencias cortas que se repiten en tándem y que no se transcriben). El centrómero y el telómero son dos regiones importantes del cromosoma compuestas por heterocromatina constitutiva. En muchos casos, los telómeros del cromosoma —secuencias de DNA altamente repetidas localizadas en los extremos de los cromosomas— se unen a la envuelta nuclear en momentos diferentes a los de la división celular.

A diferencia a la heterocromatina constitutiva, la heterocromatina facultativa varía con las actividades concretas realizadas por la célula. Incluso, difiere de tejido a tejido, e incluso puede variar a veces en una célula dada. La heterocromatina facultativa parece representar las regiones del cromosoma que se han inactivado específicamente en un tipo celular concreto. Normalmente la cantidad de heterocromatina facultativa es baja en las células embrionarias pero puede ser importante en células muy diferenciadas. La formación de heterocromatina facultativa puede ser además una manera fundamental de inactivar bloques enteros de información genética durante el desarrollo.

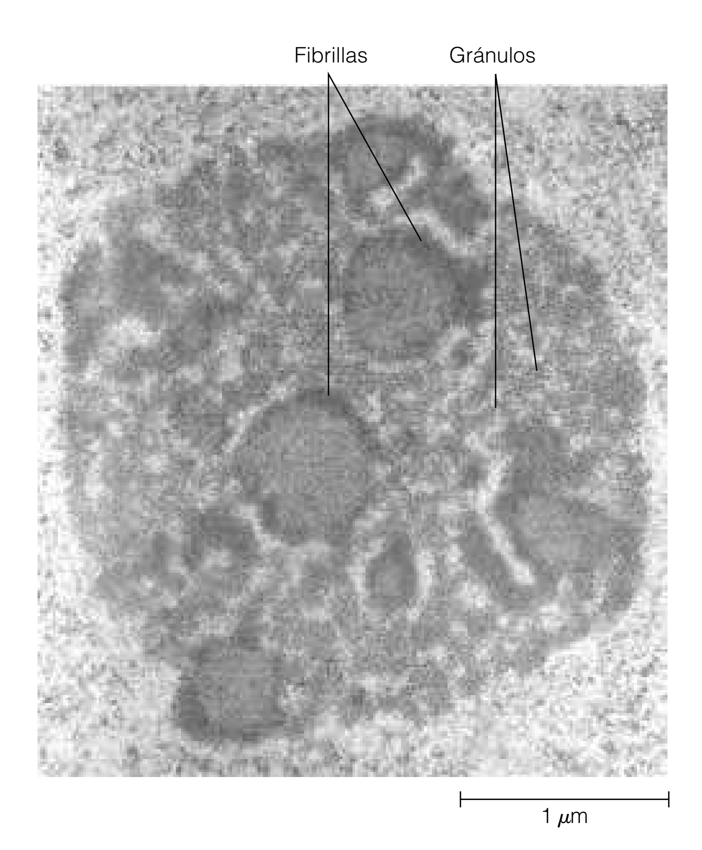


Figura 18.33 **El nucleolo.** El nucleolo es una estructura intranuclear prominente. Es una masa de fibrillas y gránulos. Las fibrillas son DNA y RNAr; los gránulos son subunidades ribosomales de reciente formación. Aquí se muestra el nucleolo de una espermatogonia, una célula que da lugar a los espermatozoides (MET).

El nucleolo está implicado en la formación de los ribosomas

Un componente estructural relevante del núcleo eucariota es el **nucleolo,** la fábrica de ribosomas de la célula. Las células eucarióticas típicas contienen uno o dos nucleolos, pero la presencia de más no es infrecuente; en ciertas situaciones, cientos o incluso miles pueden estar presentes. Normalmente, el nucleolo es una estructura esférica que mide varias micras de diámetro, pero se observan grandes variaciones en forma y tamaño. Debido a su gran tamaño relativo, los nucleolos se ven fácilmente al microscopio óptico y se observaron por primera vez hace más de 200 años. Sin embargo, los componentes estructurales del nucleolo no se identificaron con claridad hasta la llegada del microscopio electrónico en los años 50. En micrografías electrónicas de cortes finos, cada nucleolo aparece como un orgánulo sin membrana que consiste en fibrillas y gránulos (Figura 18.33). Las fibrillas contienen DNA que está siendo transcrito en *RNA ribosómico (rRNA)*, el componente RNA de los ribosomas. Los gránulos son moléculas de rRNA empaquetados con proteínas (importadas desde el citoplasma) para formar subunidades ribosomales. Como hemos visto antes, las subunidades ribosomales son posteriormente exportadas a través de los poros nucleares hasta el citoplasma. Debido a su papel en la síntesis de RNA, los nucleolos se marcan radiactivamente con intensidad cuando las células se exponen a precursores de RNA radiactivos (Figura 18.34).

La primera evidencia que asociaba al nucleolo con la formación de los ribosomas fue aportada a principios de los años 60 por Robert Perry, que empleó un microhaz de luz ultravioleta para destruir el nucleolo de células vivas. Tales células perdieron su capacidad para sintetizar rRNA, sugiriendo que el nucleolo está implicado en la producción de ribosomas. Surgieron evidencias adicionales a partir de estudios realizados por Donald Brown y John Gurdon en la rana de uñas africana, *Xenopus laevis.* A través de cruces genéticos es posible producir embriones de Xenopus a cuyas células les faltan los nucleolos. Brown y Gurdon descubrieron que tales embriones, denominados *mutantes anucleolados*, no podían sintetizar rRNA y por tanto morían durante el desarrollo temprano, implicando otra vez al nucleolo en la formación de ribosomas.

Si el rRNA se sintetiza en el nucleolo, entonces las secuencias de DNA que codifican para este RNA deben residir también en el nucleolo. Esta predicción se ha verificado

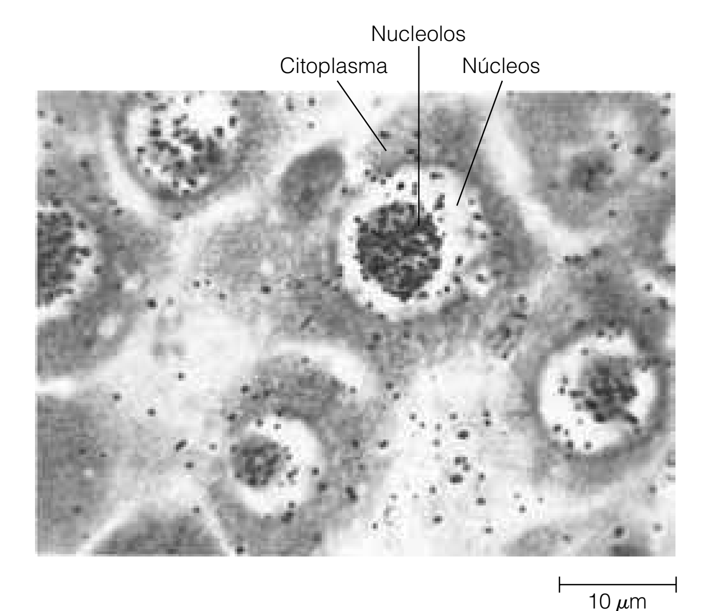


Figura 18.34 El nucleolo es un lugar de síntesis de RNA. Para demostrar el papel del nucleolo en la síntesis del RNA, se le inyectó a una rata citidina-^{3}H, un precursor de RNA marcado radiactivamente. Cinco horas más tarde, se retiró el tejido hepático y se sometió a una autorradiografía. Los puntos negros sobre los núcleos de esta autorradiografía indican que el ^{3}H se concentra en el nucleolo (MET).

mostrando que los nucleolos aislados contienen una **región organizadora del nucleolo** (NOR del inglés *nucleolus organizer region*), un tramo de DNA que lleva copias múltiples de los genes para rRNA. Estos genes múltiples para rRNA aparecen en todos los genomas e incluso son un ejemplo significativo de DNA repetido que porta información genética. El número de copias de los genes de rRNA varía de forma significativa entre especies, las células animales, a menudo, contienen cientos de copias pero las células de plantas normalmente contienen miles de copias. Las copias múltiples se agrupan en uno o más NOR, que pueden residir en más de un cromosoma; en cada NOR, las copias múltiples del gen se disponen en tándem. Un único nucleolo puede contener genes de rRNA derivados de más de un NOR. Por ejemplo, el genoma humano tiene cinco NORs por cromosoma haploide, o diez por núcleo diploide, cada uno localizado cerca del extremo de un cromosoma diferente. Pero en vez de diez nucleolos separados, el núcleo humano típico tiene un único nucleolo grande que contiene bucles de cromatina derivados de diez cromosomas separados.

El tamaño del nucleolo está relacionado con su nivel de actividad. En las células que tienen una elevada tasa de síntesis de proteínas y por tanto necesidad de muchos ribosomas, los nucleolos tienden a ser grandes y cuentan con entre un 20 y un 25% del volumen total del núcleo. En células menos activas, los nucleolos son mucho más pequeños. La principal diferencia es la cantidad de componente granular presente. Las células que producen muchos ribosomas transcriben, procesan y empaquetan grandes cantidades de rRNA y tienen niveles más altos de subunidades ribosomales parcialmente completas y estables disponibles en el nucleolo, a lo que debe su destacado componente granular.

El nucleolo desaparece durante la mitosis, por lo menos en las células de plantas superiores y de animales. A medida que la célula se aproxima a la división, la cromatina se condensa en cromosomas compactos, este hecho va acompañado por la reducción y posterior desaparición del nucleolo. Esto se ajusta perfectamente a nuestros conocimientos actuales sobre la composición y función del nucleolo: los bucles de cromatina del nucleolo extendidos dejan de ser transcritos a medida que se enrollan y se pliegan y cualquier proteína ribosomal o rRNA remanente se dispersa o se degrada. A medida que la mitosis termina, la cromatina se desenrolla, las regiones NOR forman bucles otra vez, y la síntesis de rRNA continúa. En las células humanas, es la única ocasión en la que las 10 regiones NOR de los núcleos diploides son evidentes; a medida que la síntesis de rRNA empieza otra vez, se hacen visibles diez pequeños nucleolos, cerca del extremo de cada uno de los diez cromosomas. A medida que estos nucleolos se hacen grandes, se fusionan rápidamente en el único gran nucleolo que se observa en las células humanas que no están en proceso de división.

Aunque su función principal está claramente relacionada con la producción de ribosomas, el nucleolo contiene algunas moléculas cuya presencia sugiere un papel en otras actividades adicionales, tales como la exportación desde el núcleo, la modificación química de pequeños RNAs, e incluso el control de la división celular. Los microscopistas también han identificado varios tipos de *cuerpos nucleares* pequeños que, como el nucleolo, son estructuras no rodeadas por membrana compuestas por pequeñas fibras y/o gránulos con configuraciones peculiares. Se han caracterizado varios tipos de cuerpos nucleares, cada uno contiene un grupo diferente de proteínas residentes. Aunque los detalles no se conocen bien, se piensa que los cuerpos nucleares desempeñan diversos papeles relacionados con el procesamiento y manejo de moléculas de RNA producidas en el núcleo.

Perspectiva

El descubrimiento del DNA se remonta a los primeros estudios de Miescher, pero no fue hasta mediados del siglo XX cuando los experimentos en bacterias de tipo neumococo y experimentos en el bacteriófago T12 revelaron con claridad que el DNA era el material genético. A este trabajo le siguió el esclarecimiento por Watson y Crick de la estructura en doble hélice del DNA, uno de los puntos de referencia de la biología del siglo XX. Los puentes de hidrógeno que mantienen unidas las dos hebras de la doble hélice sólo ajustan cuando la base A se empareja con T, y la base G se empareja con C. Debido a que las dos hebras se mantienen juntas por puentes no covalentes relativamente débiles, las dos hebras se pueden separar fácilmente durante la replicación del DNA y la síntesis de RNA.

Los biólogos moleculares han desarrollado diversas herramientas poderosas para estudiar el DNA. Por ejemplo, las enzimas de restricción aisladas a partir de bacterias, se pueden usar para cortar el DNA en fragmentos reproducibles, lo suficientemente cortos como para ser fácilmente manipulables en el laboratorio. En este capítulo, describimos cómo el uso de las enzimas de restricción hace más sencillo el estudio de la estructura de las moléculas de DNA muy largas. Más tarde, en el Capítulo 20, veremos cómo las enzimas de restricción son también la clave para hacer DNA recombinante.

El DNA (o RNA para algunos virus) que constituye un juego completo de la información genética de un organismo se denomina su genoma. Para la mayoría de virus y procariotas, el genoma consiste en una molécula de DNA sencilla o en un número pequeño de ellas. Los eucariotas tienen un genoma nuclear dividido entre múltiples cromosomas, cada uno de ellos tiene una molécula de DNA muy larga. Los eucariotas también tienen un genoma mitocondrial, y en el caso de las plantas un genoma cloroplástico. Los biólogos moleculares han desarrollado diversas herramientas poderosas para estudiar los genomas. Por ejemplo, las enzimas de restricción aisladas de las bacterias, se pueden usar para cortar el DNA en fragmentos reproducibles que son lo suficientemente cortos como para ser fácilmente manipulables en el laboratorio. Las técnicas de secuenciación automática de DNA han permitido a los científicos determinar la secuencia de bases completa de los genomas de numerosos organismos desde las bacterias a los humanos. Una de las características más llamativas de los genomas nucleares de los eucariotas, especialmente de los organismos multicelulares, es la enorme fracción de DNA que no codifica para RNA ni para síntesis de proteínas. La mayoría de DNA no codificante consiste en secuencias repetidas. Se conoce relativamente poco sobre las funciones del DNA repetido, pero alguna de estas secuencias puede desempeñar un papel estructural en el cromosoma, y otras pueden proporcionar fuentes de variabilidad evolutiva para el genoma.

La enorme longitud de las moléculas de DNA presente en las células (e incluso en los virus) necesita de un embalaje considerable). Tanto en los procariotas como en el núcleo de las células eucariotas, el DNA forma complejos con proteínas, pero este empaquetamiento es más elaborado en eucariotas. La unidad básica estructural del cromosoma eucariota es el nucleosoma, que consiste en una pequeña longitud de DNA enrollado alrededor de una partícula proteica construida a partir de ocho moléculas de histonas. Hileras de nucleosomas («cuentas en un collar») se empaquetan juntas para formar una fibra de cromatina de 30 nm, que puede seguir curvándose y plegándose. Cuanto mayor sea el empaquetamiento del DNA, menos probable es que éste sea activo transcripcionalmente en la célula. En las células que no están en división y que están transcribiendo DNA de manera activa, la mayoría de la cromatina está en una forma relativamente extendida, y bastante difusa denominada eucromatina. Sin embargo, otras porciones de la cromatina están en un estado altamente condensado denominado heterocromatina. Durante la división celular, toda la cromatina se compacta formando cromosomas diferenciados visibles con el microscopio óptico.

Los cromosomas eucariotas se localizan en el núcleo. La envuelta nuclear de doble membrana está perforada por poros nucleares que median el transporte bidireccional de materiales entre el nucleoplasma y el citosol. Dentro de cada poro se encuentra una estructura proteica elaborada, denominada complejo del poro nuclear. Los iones y pequeñas moléculas con un tamaño hasta 9 nm de diámetro, difunden pasivamente a través de canales acuosos en el complejo del poro; las partículas mayores se transportan activamente a su través; los poros nucleares controlan además el movimiento hacia el interior de las proteínas que se usan en el núcleo y el movimiento hacia el exterior del RNA y de las subunidades ribosomales. Se piensa que una red estructural de fibras, denominada matriz nuclear está implicada en la localización de otras actividades nucleares, tales como la replicación del DNA y la producción del RNA mensajero, a zonas diferenciadas del núcleo.

Problemas

Los problemas de mayor dificultad están marcados con un •.

18.1 El material genético. Marque cada una de las siguientes aseveraciones relativas a la naturaleza química del material genético con una A si la afirmación se realizó algunas décadas *antes* de 1944, con una I si pertenece al *ínterin* 1944-1952, con una P si se ajusta más al periodo *posterior* a 1952, o con una N si *nunca* fue un concepto ampliamente aceptado.

(a) El DNA de doble hebra contiene cantidades iguales de las bases A y T, e iguales cantidades de las bases G y C, pero la significación de estas equivalencias es un misterio.

(b) El material genético de organismos superiores es probablemente proteína en su mayoría.

(c) El DNA es el material genético tanto de las bacterias como de sus fagos.

(d) El DNA es químicamente demasiado simple como para ser considerado la información genética de cualquier célula.

(e) La nucleína es un componente importante del citoplasma.

(f) El DNA puede ser el material genético de las células bacterianas, pero todavía es un asunto pendiente su significado en organismos superiores.

(g) Las cepas lisas (S) de neumococo son capaces de convertir a las cepas rugosas (R) no patógenas, en cepas S patógenas, pero todavía no sabemos qué componente de las células S causa esa transformación.

(h) Una vez adsorbido en una célula huésped, el bacteriófago inyecta sus proteínas a la bacteria.

18.2 Conocimientos previos. Prácticamente cada experimento realizado por los biólogos se cimentó en conocimientos procedentes de experimentos previos.

(a) ¿Qué significado tuvo para Avery y cols., el descubrimiento (realizado en 1932 por J. L. Alloway) de que la misma clase de transformación de células R en células S que Griffith observó en ratones, se podía también demostrar con células de neumococo aisladas en cultivo?

(b) ¿Qué significó para Hershey y Chase la siguiente explicación (realizada en 1951 por R. M. Herriott)? «Un virus puede funcionar como una pequeña aguja hipodérmica llena de principios transformantes; el virus, como tal, no entra nunca en las células; solamente la cola contacta con el huésped y quizás, realiza enzimáticamente un pequeño agujero en la membrana externa y entonces el ácido nucleico de la cabeza del virus fluye hacia el interior de la célula».

(c) ¿Qué significaron para Watson y Crick los datos de sus colegas de Cambridge de la manera tan particular en la que se disponían A, G, C y T a pH fisiológico permitía la formación de puentes de hidrógeno específicos?

(d) ¿Cómo los descubrimientos de Hershey y Chase ayudan a explicar un informe preliminar (de T. F. Anderson y R. M. Herriot) en el que, al suspender partículas virales en agua destilada antes de añadirlos a un cultivo bacteriano, el bacteriófago T12 se abre violentamente, por ósmosis, y pierde su capacidad de reproducirse?

18.3 Estructura del DNA. Examine con detenimiento la doble hebra de la molécula de DNA que se muestra y fíjese en que presenta una doble simetría de rotación:

3′ A—G—C—G—C—T—A—T—A—G—C—G—C—T 5′

5′ T—C—G—C—G—A—T—A—T—C—G—C—G—A 3′

(a) Marque cada una de las siguientes aseveraciones con una V si es verdadero o con una F si es falso.

(b) No existe forma de distinguir el extremo derecho de la doble hélice del extremo izquierdo.

(c) Si una solución de estas moléculas se calienta hasta desnaturalizarlas, cada molécula de cadena sencilla de la solución sería capaz de hibridar con una de cada dos moléculas.

(d) Si la molécula se corta en dos mitades por su punto medio, sería posible distinguir la mitad izquierda de la mitad derecha.

(e) Si las dos cadenas sencillas se separan, no sería posible distinguir una hebra de la otra.

(f) En una cadena sencilla de esta molécula, sería imposible determinar cuál es el extremo 3′ y cuál el extremo 5′.

18.4 Mapas de restricción de DNA. El genoma de un bacteriófago recién descubierto es una molécula de DNA lineal con una longitud de 10.500 pares de nucleótidos. Se incubó una muestra de ese DNA con una enzima de restricción X y otra muestra con la enzima de restricción Y. Por electroforesis en gel, se han determinado las longitudes (en miles de pares de bases) de los fragmentos de restricción producidos por las dos enzimas como sigue:

Enzima X: Fragmento X-1 = 4,5; X-2 = 3,6; X-3 = 2,4

Enzima Y: Fragmento Y-1 = 5,2; Y-2 = 3,8; Y-3 = 1,5

Lo siguiente, es que los fragmentos obtenidos en la reacción con la enzima X se aíslan y se tratan con la enzima Y, y los fragmentos de la reacción de la enzima Y se tratan con la enzima X. Los resultados son los siguientes:

Los fragmentos de X tratados con Y: X-1 ⟶ 4,5 (no cambia)
X-2 ⟶ 2,1 + 1,5
X-3 ⟶ 1,7 + 0,7

Los fragmentos de Y tratados con X: Y-1 ⟶ 4,5 + 0,7
Y-2 ⟶ 2,1 + 1,7
Y-3 ⟶ 1,5 (no cambia)

Dibuje un mapa de restricción del DNA del fago, indicando la posición de todos los sitios de restricción de la enzima X y de la enzima Y, y la longitud del DNA entre ellos.

18.5 Secuenciación del DNA. Ha aislado el fragmento de DNA del Problema 18.3 pero no sabe su secuencia completa. Conociendo la especificidad de la enzima de restricción usada, puede saber las cuatro primeras bases del extremo de la izquierda y ha preparado un primer (cebador) de DNA de cadena sencilla de secuencia 5′ T—C—G—C 3′. Explique cómo determinaría el resto de la secuencia utilizando dideoxinucleótidos marcados con colorantes. Dibuje el patrón de gel que se observaría, indicando la secuencia de bases de DNA de cada banda y el patrón de colores que detectaría la cámara en un secuenciador de DNA.

•**18.6 Fusión del DNA**. En la Figura 18.35 se muestran las curvas de fusión para dos muestras de DNA que se desnaturalizaron térmicamente en las mismas condiciones.

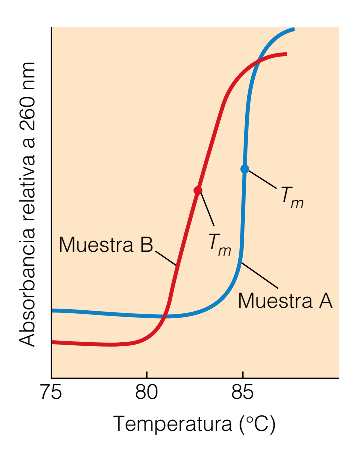


Figura 18.35 Desnaturalización térmica de dos muestras de DNA. (*Véase* Problema 18.6.)

(a) ¿Qué conclusiones se sacan con respecto a la composición de bases de las dos muestras? Explíquelo.

(b) ¿Podría explicar la excesiva pendiente de la curva de fusión de la muestra A?

(c) La formamida y la urea son agentes conocidos por formar puentes de hidrógeno con purinas y pirimidinas. ¿Qué efectos, si es que hay alguno, tendría sobre las curvas de fusión, la inclusión en la mezcla de incubación, de pequeñas cantidades de formamida o de urea?

•**18.7 Renaturalización del DNA.** Se le dan dos muestras de DNA, cada una de las cuales funde a 92 °C cuando se realiza una desnaturalización térmica. Después de desnaturalizar el DNA, mezcla las dos muestras juntas y enfría la muestra para permitir a las hebras de DNA que se reasocien. Cuando el DNA nuevamente reasociado se desnaturaliza por segunda vez, la muestra funde a 85 °C.

(a) ¿Cómo podría explicar la disminución de la temperatura de fusión de 92 °C a 85 °C?

(b) ¿Qué clase de experimento realizaría para explicar su hipótesis?

(c) Si el DNA nuevamente reasociado ha fundido a 92 °C en vez de a 85 °C, ¿qué conclusiones extraería con respecto a la secuencia de bases de las dos muestras de DNA iniciales?

•**18.8 Nucleosomas.** Realiza un experimento en el que aísle cromatina a partir de espermatozoides de erizo de mar y los digiere brevemente con nucleasa de micrococo. Cuando desaparecen las proteínas y el DNA purificado resultante, se analiza por electroforesis en gel, observa una serie de fragmentos de DNA que tienen una longitud, en pares de bases, múltiplos de 260 (es decir, 260 pb, 520 pb, 780 pb, y así sucesivamente).

(a) Aunque estos resultados difieren en alguna medida de los resultados típicos tratados en el capítulo, explique por qué todavía apuntan a la posible existencia de nucleosomas en este tipo celular.

(b) ¿Qué se puede concluir con respecto a la cantidad de DNA asociada a cada nucleosoma?

(c) Si la cromatina se analiza inmediatamente después de la digestión con nucleasa de micrococo por centrifugación en gradiente de densidad, describa qué esperaría ver.

(d) Suponga que realiza un experimento en el que la cromatina se digiere durante un periodo mucho más largo de tiempo con nucleasa de micrococo antes de retirar las proteínas de la cromatina. Cuando la preparación de DNA resultante se analiza por electroforesis, todo el DNA aparece en forma de fragmentos de 146 pb de longitud. ¿Qué le sugiere con respecto a la longitud del espaciador de DNA en este tipo celular?

18.9 Estructura y función nuclear. Indique las consecuencias para la función y la estructura nuclear de cada una de las siguientes observaciones experimentales.

(a) La sacarosa atraviesa la envuelta nuclear tan rápidamente que su velocidad de movimiento no se puede medir con precisión.

(b) Las partículas de oro coloidal con un diámetro de 5,5 nm se equilibran rápidamente entre el núcleo y el citoplasma cuando se inyectan en una ameba, pero las partículas de oro con un diámetro de 15 nm no lo hacen.

(c) A veces, los complejos del poro nuclear se tiñen con fuerza para ribonucleoproteínas.

(d) Si las partículas de oro de hasta 26 nm de diámetro se cubren con un polipéptido que contiene una señal de localización nuclear (SLN) y se inyectan en el citoplasma de una célula viva, se transportan al núcleo. Sin embargo, si se inyectan en el núcleo, se quedan allí.

(e) Cuando se analizan por electroforesis, muchas de las proteínas de la envuelta nuclear parecen ser las mismas a las encontradas en el retículo endoplásmico.

(f) Las proteínas ribosomales se sintetizan en el citoplasma pero se empaquetan con el rRNA, en subunidades ribosomales en el núcleo.

(g) Si los nucleolos se irradian con un microhaz de luz ultravioleta, se inhibe la síntesis del RNA ribosómico.

(h) El tratamiento de los núcleos con el detergente no iónico X-100 disuelve la envuelta nuclear pero deja el núcleo intacto.

18.10 Transporte nuclear. ¿Qué determina si una partícula proteica será transportada activamente, hacia el interior del núcleo, hacia el exterior del núcleo, o hacia ninguno de los dos lados? Explique el mecanismo implicado.

18.11 Nucleolo. Indique si cada una de las siguientes aseveraciones es verdadera (V) o falsa (F). Si es falsa, reescriba la frase, para hacerla verdadera.

(a) Los nucleolos son estructuras rodeadas de membrana presentes en los núcleos eucariotas.

(b) Las fibrillas que se observan en las micrografías electrónicas de los nucleolos contienen DNA y RNA.

(c) El DNA de los nucleolos porta los genes de los t-RNAs de la célula, que están presentes en grupos de copias múltiples.

(d) Un único nucleolo siempre corresponde con una única región organizadora nucleolar (NOR).

(e) Cuando a la célula se le proporcionan ribonucleótidos marcados radiactivamente, los nucleolos aparecen marcados fuertemente.

(f) En animales y plantas, la desaparición del nucleolo durante la mitosis, está relacionada con el cese de la síntesis de ribosomas.

Bibliografía recomendada

Las referencias con importancia histórica están marcadas con •.

Naturaleza química del material genético

•Avery, O. T., C. M. MacLeod y M. McCarty. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* Type III. *J. Exp. Med.* 79 (1944): 137.

•Chargaff, E. Preface to a grammar of biology: A hundred years of nucleic acid research. *Science* 172 (1971): 637.

•Hershey, A. D. y M. Chase. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* 36 (1952): 39.

•Portugal, F. H. y J. S. Cohen. *The Century of DNA: A History of the Discovery of the Structure and Function of the Genetic Substance.* Cambridge, MA: MIT Press, 1977.

Estructura del DNA

•Bauer, W. R., F. H. C. Crick y J. H. White. Supercoiled DNA. *Sci. Amer.* 243 (July 1980): 118.

Marmur, J. DNA strand separation, renaturation and hybridization. *Trends Biochem. Sci.* 19 (1994): 343.

•Sanger, F. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* 214 (1981): 1205.

•Watson, J. D. y F. H. C. Crick. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171 (1953): 737.

Organización del DNA en genomas

Blattner, F. R., G. Plunkett III, C. A. Bloch *et al.* The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277 (1997): 1453.

•Britten, R. J. y D. E. Kohne. Repeated sequences of DNA. *Science* 161 (1968): 529.

Ezzell, C. Proteins rule. *Sci. Amer.* 286 (April 2002): 40.

Findlay, I., A. Taylor, P. Quirke, R. Frazier y A. Urquhart. DNA fingerprinting from single cells. *Nature* 389 (1997): 555.

International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409 (2001): 860.

Marte, B., ed. Nature Insight: Proteomics. *Nature* 422 (2003): 191–237.

Moxon, E. R. y C. Willis. DNA microsatellites: Agents of evolution? *Sci. Amer.* 280 (enero de 1999): 94.

Venter, J. C .*et al.* The sequence of the human genome. *Science* 291 (2001): 1304.

Empaquetamiento del DNA

•Kornberg, R. D. y A. Klug. The nucleosome. *Sci. Amer.* 244 (February 1981): 52.

Kornberg, R. D. y Y. Lorch. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98 (1999): 285.

van Holde, K. y J. Zlatanova. Chromatin higher order structure: Chasing a mirage? *J. Biol. Chem.* 270 (1995): 8373.

Wallace, D. C. Mitochondrial DNA in aging and disease. *Sci. Amer.* 277 (August 1997): 40.

Wolffe, A. *Chromatin: Structure and Function,* 3d ed. San Diego: Academic Press, 1998.

El núcleo

Berezney, R. y K. W. Jeon, eds. *Nuclear Matrix: Structural and Functional Organization.* San Diego: Academic Press, 1997.

Carmo-Fonseca, M., L. Mendes-Soares y I. Campos. To be or not to be in the nucleolus. *Nature Cell Biol.* 2 (2000): E107.

Daneholt, B. A look at messenger RNP moving through the nuclear pore. *Cell* 88 (1997): 585.

Dingwall, C. y R. Laskey. The nuclear membrane. *Science* 258 (1992): 942.

Kuersten, S., M. Ohno y I. W. Mattaj. Nucleoplasmic transport: Ran, beta and beyond. *Trends Cell Biol.* 11 (2001): 497.

Matera, A. G. Nuclear bodies: Subdomains of the interchromatin space. *Trends Cell Biol.* 9 (1999): 302.

Parada, L. A., J. J. Roix y T. Misteli. An uncertainty principle in chromosome positioning. *Trends Cell Biol.* 13 (2003): 393.

Rout, M. P. *et al.* Virtual gating and nuclear transport: the hole picture. *Trends Cell Biol.* 13 (2003): 622.

Shaw, P. J. y E. G. Jordan. The nucleolus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11 (1995): 93.

Weis, K. Importins and exportins: How to get in and out of the nucleus. *Trends Biochem. Sci.* 23 (1998): 185.

Wente, S. R. Gatekeepers of the nucleus. *Science* 288 (2000): 1374.

19

Ciclo celular, replicación del DNA y mitosis

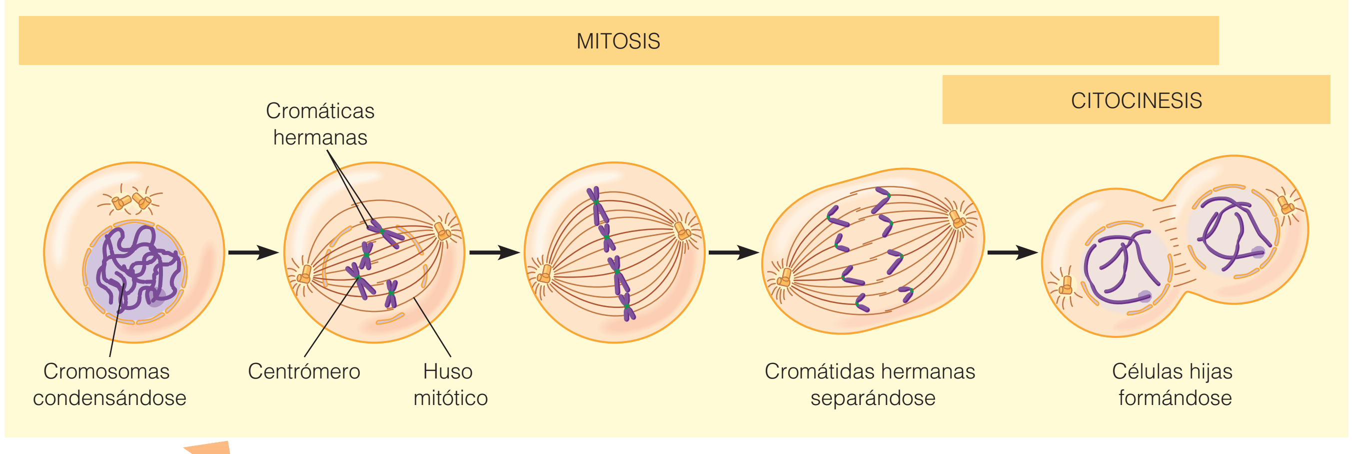
La capacidad de crecer y reproducirse es una propiedad fundamental de los organismos vivos. Ya esté el organismo compuesto por una única célula o por trillones, las células deben crecer y dividirse de una manera regulada. El crecimiento celular se lleva a cabo a través de la síntesis de nuevas moléculas de proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono y lípidos. Debido a que la acumulación de estas moléculas produce un incremento en el volumen celular, la membrana plasmática crece para evitar que la célula estalle. Pero las células no pueden crecer ilimitadamente; el crecimiento celular lleva asociado un descenso en su relación superficie/volumen y por lo tanto, en su capacidad para realizar un intercambio eficaz con el medio. Así, el crecimiento celular viene acompañado generalmente por la **división celular**, en la que una célula da lugar a dos células hijas (el término *hija* se utiliza por convención y no significa que las células tengan género). En los organimos unicelulares, la división celular aumenta el número total de individuos de una población. En los organismos pluricelulares, la división celular aumenta el número de células, que produce el crecimiento del organismo y reemplaza a las células muertas. En el ser humano adulto, cerca de 2 millones de células madres de la médula ósea se dividen para mantener constante el número de eritrocitos en el cuerpo.

Cuando las células crecen y se dividen, las células hijas recién formadas son generalmente duplicados genéticos de la célula parental, con la misma, o casi la misma secuencia de DNA. Por lo tanto, la información genética en el núcleo de la célula madre debe duplicarse y distribuirse cuidadosamente a las células hijas durante el proceso de división. Para llevar a cabo esta tarea, la célula pasa por una serie de etapas, que se conocen en su conjunto como ciclo celular. En este capítulo, analizaremos los procesos asociados al ciclo celular, centrándonos en primer lugar en los mecanismos que aseguran que cada nueva célula reciba la información genética completa, y después examinaremos cómo se regula el ciclo para satisfacer las necesidades del organismo.

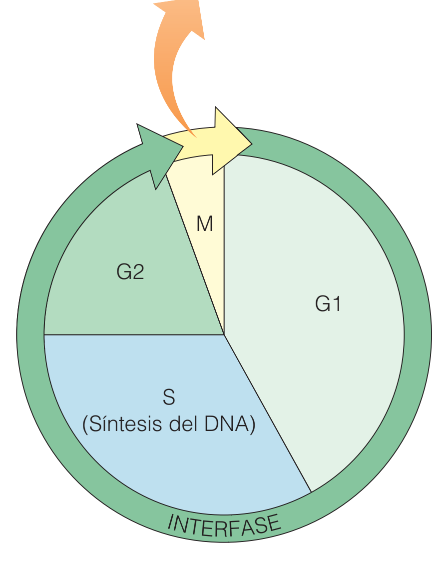
Visión general del ciclo celular

El ciclo celular comienza cuando se forman dos nuevas células hijas, por la división de una única célula madre, y finaliza cuando una de estas dos células se divide de nuevo en otras dos células hijas (Figura 19.1). Para los primeros biólogos que estudiaron las células eucariotas con el microscopio, los procesos más espectaculares en la vida de una célula, eran aquellos relacionados con el punto del ciclo celular en el que una célula se divide. Este proceso de división, denominado **fase M**, incluye dos etapas solapadas en las que primero se divide el núcleo y después el citoplasma. La división nuclear se conoce como **mitosis**, y la división del citoplasma para producir dos células hijas se denomina **citocinesis**.

Los cromosomas son los protagonistas del drama mitótico. Como se puede observar en la Figura 19.1a, el comienzo de la mitosis está marcado por una condensación (enrollamiento y plegamiento) de la cromatina de la célula, que hace que los cromosomas sean lo suficientemente densos como para que se puedan observar al microscopio. La división del DNA ya ha tenido lugar, así que cada cromosoma consiste en dos copias de cromosomas que permanecerán unidos hasta que la célula se divida. Mientras permanezcan unidos, los dos nuevos cromosomas se denominan **cromátidas hermanas**. A medida que las cromátidas se hacen visibles, la envuelta nuclear se rompe en fragmen-



(a) Fase M (mitótica)



(b) El ciclo celular

Figura 19.1. El ciclo celular eucariota. (**a**) La fase M (mitótica), es decir, el proceso de división celular, es la más fácilmente reconocible desde un punto de vista morfológico. Está formada por dos procesos solapados, mitosis y citocinesis. En la mitosis, el huso mitótico separa los cromosomas duplicados y condensados en los dos núcleos hijos. En la citocinesis, el citoplasma se divide para producir dos células hijas genéticamente idénticas. (**b**) Se dice que la célula, entre las divisiones, se encuentra en interfase, que está compuesta por la fase S (el periodo en el que se duplica el DNA) y dos fases intercaladas, denominadas G1 y G2. La célula continúa creciendo a lo largo de la interfase, un periodo de elevada actividad metabólica.

tos. Después, en un baile orquestado por los microtúbulos del *huso mitótico*, las cromátidas hermanas se separan y —en este momento cada una es ya un cromosoma— emigran a cada extremo de la célula. Mientras tanto, la citocinesis ya ha comenzado, y los cromosomas de las dos células hijas son envueltos por membranas nucleares nuevas a la vez que se completa la división celular.

Aunque la mitosis es sorprendente desde un punto de vista visual, sólo representa una pequeña parte del total del ciclo celular; en una célula normal de un mamífero, la mitosis dura menos de una hora. Las células se encuentran la mayor parte de su tiempo en la fase de crecimiento entre divisiones, denominada **interfase** (Figura 19.1b). La mayor parte de los componentes celulares se sintetizan continuamente durante la interfase, de tal manera que la masa celular aumenta gradualmente conforme se acerca la división. Es durante la interfase cuando el DNA nuclear se duplica y en experimentos basados en el uso de precursores radiactivos, se demostró que el nuevo DNA se sintetiza durante una parte de la interfase, conocida como **fase S** (de síntesis). Un intervalo de tiempo («gap») llamado **fase G1,** separa la fase S de la fase M precedente, y un segundo intervalo, la **fase G2**, separa el final de la fase S del comienzo de la fase M siguiente.

A pesar de que las células de un organismo pluricelular tienen tasas de división variadas, la mayoría de los estudios sobre el ciclo celular se han realizado en células en cultivo, donde la duración del ciclo tiende a ser muy parecida entre los diferentes tipos celulares, Podemos determinar la duración total del ciclo celular —el *tiempo de generación*— de células en cultivo simplemente contando las células en el microscopio y determinando cuánto tiempo tarda la población celular en duplicarse. En células de mamífero, por ejemplo, el ciclo completo suele durar de 18 a 24 h. Una vez que sabemos la duración total del ciclo, podemos determinar la duración de cada fase en particular. Para saber cuánto dura la fase S, podemos exponer las células a un precursor del DNA marcado radiactivamente (generalmente ^{3}H timidina) durante un periodo de tiempo corto y después examinar las células por autorradiografía. Todas aquellas cé-

lulas que presenten granos de plata en su núcleo se corresponden con la fracción de células que se encontraban en la fase S, cuando el compuesto radiactivo estaba disponible. Si multiplicamos esta fracción por la duración total del ciclo, el resultado es una estimación de la duración media de la fase S. En las células de mamíferos en cultivo, esta fracción es aproximadamente 0,33, lo que supone que la fase S tiene una duración de 6-8 h. De igual manera, podemos calcular la duración de la fase M multiplicando el tiempo de generación por el porcentaje de células que se encuentran en mitosis en cualquier momento. Este porcentaje se conoce como **índice mitótico**. El índice mitótico para las células de mamíferos en cultivo, es normalmente 3-5%, lo que indica que la fase M dura menos de una hora (habitualmente 30-45 minutos.)

A diferencia de las fases S y M, que suelen tener una duración muy parecida en todas las células de mamíferos, la duración de la fase G1 es bastante variable dependiendo del tipo celular. A pesar de que una fase G1 normal dura 8-10 horas, algunas células sólo están en ella escasos minutos, mientras que otras permanecen aquí largos periodos de tiempo. Es durante la fase G1 cuando la célula toma la decisión crucial de si se divide y cuándo se divide de nuevo. Las células que se quedan bloqueadas en la fase G1, esperando una señal que las reintroduzca en el ciclo celular, se dice que se encuentran en **G0** (**G cero**). Otras células salen del ciclo celular por completo y sufren una *diferenciación terminal*, lo que significa que no volverán a dividirse de nuevo; la mayoría de las neuronas del cuerpo se encuentran en este estado. Algunas células pueden quedar bloqueadas transitoriamente en G2. No obstante, en general, G2 es más corto que G1 y mucho más uniforme en cuanto a su duración en los diferentes tipos celulares, durando por lo general 4-6 horas.

Ahora que ya hemos echado un vistazo general al ciclo celular, pasaremos a analizarlo con más detalle. Comenzaremos examinando la fase S, ya que la síntesis de DNA es, en cierto sentido, el objetivo del ciclo celular.

Replicación del DNA

Uno de los aspectos más significativos del modelo de la doble hélice es que sugiere inmediatamente un mecanismo para la replicación del DNA. De hecho, un mes después de que Watson y Crick publicaran el artículo en el que proponían el modelo de la doble hélice, publicaron otro artículo igual de importante, que sugería cómo podría replicarse una estructura de bases apareadas. Aquí está su propuesta, en sus propias palabras:

> *Nuestro modelo del ácido desoxirribonucleico consiste, de hecho, en un par de moldes, complementarios entre sí. Suponemos que antes de la duplicación, los puentes de hidrógeno se rompen, y las dos cadenas se desenrollan y se separan. Cada hebra actúa posteriormente como un molde para la formación de una nueva cadena, por lo que finalmente obtendremos dos pares de cadenas donde antes sólo había una. Es más, la secuencia de pares de bases se habrá duplicado de una manera exacta (Watson y Crick, 1953, p. 966).*

La Figura 19.2 muestra el modelo que Watson y Crick propusieron para la replicación del DNA. El fondo de su propuesta es que una de las dos hebras de la molécula de DNA nueva proviene de la molécula molde, mientras que la otra es de nueva síntesis. Esto se denomina replicación semiconservativa, porque en cada molécula nueva se mantiene la mitad de la molécula original.

La centrifugación basada en el equilibrio en gradiente de densidad, muestra que la replicación del DNA es semiconservativa

Cinco años después de su publicación, el modelo de replicación semiconservativa del DNA de Watson y Crick fue confirmado por Matthew Meselson y Franklin Stahl. Desarrollaron un método ingenioso, en colaboración con Je-

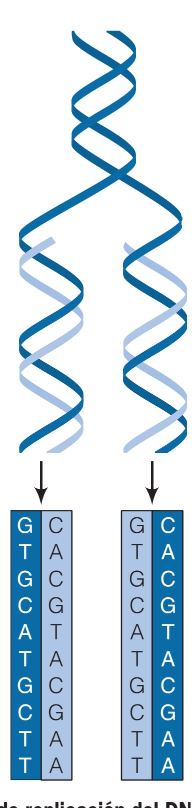


Figura 19.2 El modelo de replicación del DNA de Watson y Crick. Watson y Crick propusieron en 1953 que la hélice doble del DNA se replica de una manera semiconservativa, usando un modelo como éste para ilustrar tal principio. La hélice de doble cadena se desenrolla, y cada hebra parental actúa como un molde para la síntesis de una hebra hija complementaria, formada siguiendo las reglas de apareamiento de bases. A, T, C y G representan los nucleótidos adenina, timina, citosina y guanina. A se empareja con T y G con C.

rome Vinograd, para diferenciar la replicación semiconservativa de otras posibilidades. Utilizaron en sus estudios dos isótopos del nitrógeno, ^{14}N y ^{15}N, para poder diferenciar las hebras de nueva formación de las originales. Se cultivaron durante varias generaciones bacterias en un medio con cloruro amónico marcado con ^{15}N, con el fin de que las bacterias incorporasen a su DNA este isótopo *pesado* (pero no radiactivo) del nitrógeno. Después, se transfirieron las células que habían incorporado el ^{15}N a su DNA a un medio de crecimiento que contenía el isótopo *ligero* normal del hidrógeno, ^{14}N. Toda hebra de DNA sintetizada a partir de este momento, incorporará ^{14}N en vez de ^{15}N.

Debido a que el DNA marcado con ^{15}N es mucho más denso que el marcado con ^{14}N, se pueden diferenciar las hebras nuevas de las viejas por centrifugación **de equilibrio en gradiente de densidad**, una técnica que ya vimos cuando tratamos la separación de los orgánulos (*véase* Figura 12A.7). En resumen, esta técnica permite la separación de orgánulos o de moléculas con diferentes densidades, mediante su centrifugación en una solución que contiene un gradiente de densidad creciente desde la parte superior del tubo a la inferior. Como consecuencia de la fuerza de centrifugación, las partículas migran «hacia abajo» del tubo (en realidad, se mueven hacia fuera, alejándose del eje de rotación) hasta que encuentran una densidad igual a la suya. Después permanecen en esta densidad de equilibrio y forman una banda en esa parte del tubo, que puede ser recogida tras la centrifugación.

En el análisis del DNA se utiliza frecuentemente cloruro de Cesio (CsCl) en la centrifugación por equilibrio en gradiente de densidad, ya que es una sal de un metal pesado que forma soluciones de una elevada densidad. El DNA que se quiere analizar se mezcla simplemente con cloruro de cesio y la solución se centrifuga a alta velocidad durante un tiempo relativamente largo (por ejemplo, a 80.000 rpm durante 8 horas en una centrífuga moderna). A medida que se establece el gradiente de densidad de cloruro de cesio, las moléculas de DNA flotarán o se hundirán, hasta alcanzar sus posiciones de equilibrio de densidad. La diferencia de densidad entre el DNA pesado (que contiene ^{15}N) y el ligero (que contiene ^{14}N) hace que se coloquen en diferentes posiciones en el gradiente (Figura 19.3).

Meselson y Stahl usaron este método para analizar el DNA de bacterias que fueron cultivadas durante varias generaciones en ^{15}N, y que fueron después transferidas a un medio con ^{14}N durante uno o más ciclos de replicación adicionales (Figura 19.4). ¿Qué resultado se esperaría de un mecanismo de replicación semiconservativo del DNA? Después de un ciclo de replicación en un medio con ^{14}N, cada molécula de DNA constaría de una hebra ^{15}N (la hebra antigua) y una hebra ^{14}N (la hebra nueva), y por tanto tendría una densidad intermedia entre el DNA pesado y el DNA li-

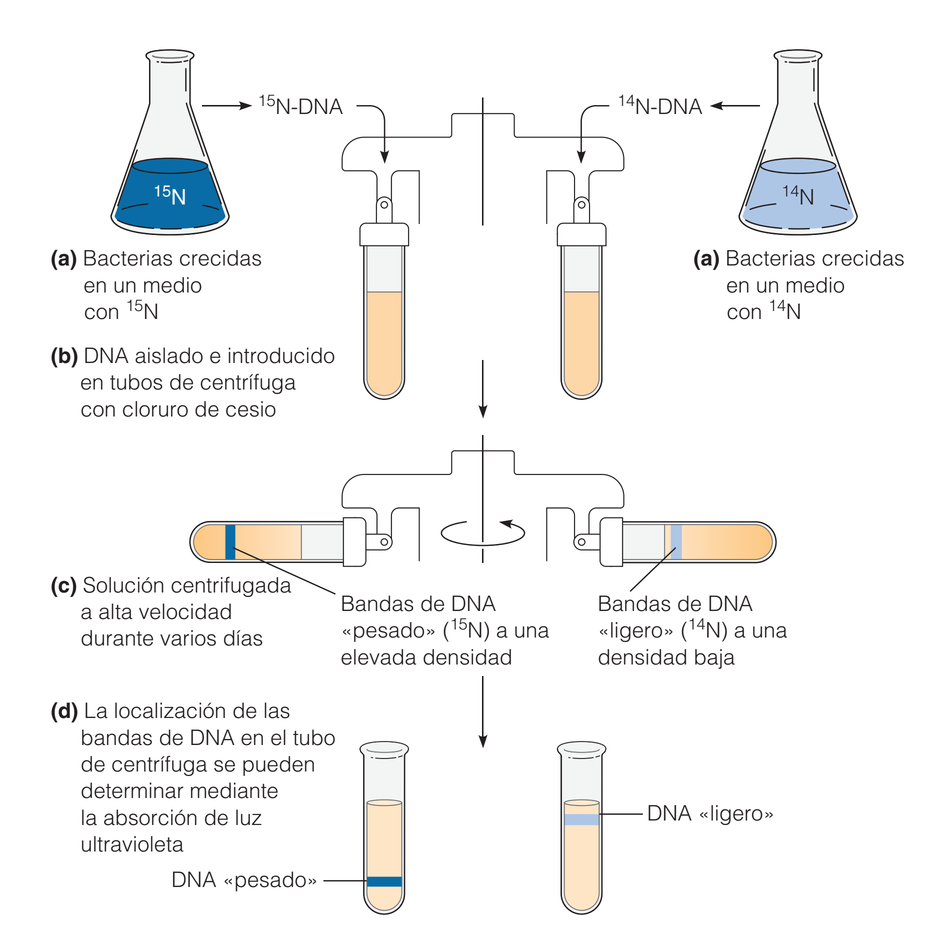


Figura 19.3 Análisis del DNA por centrifugación por equilibrio en gradiente de densidad. La centrifugación por equilibrio en gradiente de densidad se puede utilizar para diferenciar DNA pesado (que contiene ^{15}N) y DNA ligero (que contiene ^{14}N). (**a**) Si se crecen bacterias durante varias generaciones en un medio con ^{15}N o ^{14}N, podemos diferenciar el DNA de los dos cultivos por centrifugación (**b**) en tubos que contienen una concentración apropiada de cloruro de cesio y (**c**) centrifugando los tubos a una velocidad elevada. El cloruro de cesio forma un gradiente de densidad creciente en estas condiciones y las moléculas de DNA se mueven en el gradiente a una posición correspondiente a su densidad de equilibrio. De esta manera, el DNA que contenga átomos de ^{15}N formará una banda de mayor densidad que la que formará el DNA que contenga átomos de ^{14}N. (**d**) Después de su centrifugación, se pueden observar las bandas de DNA mediante la absorción de luz ultravioleta. La diferencia de densidad (alrededor del 1%), es suficiente no sólo para determinar las dos bandas, sino también para detectar moléculas de DNA híbridas, con una densidad intermedia, como muestra la Figura 19.4c.

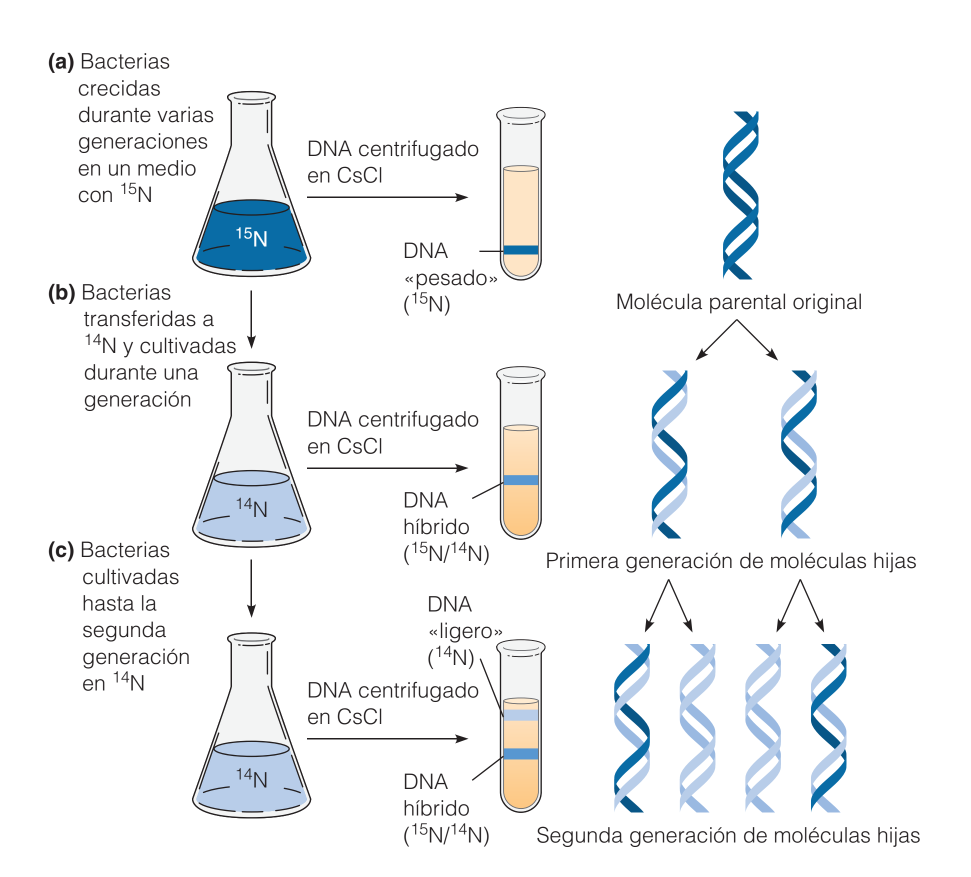


Figura 19.4 Replicación semiconservativa del DNA marcado por densidad. Meselson y Stahl (**a**) cultivaron bacterias durante muchas generaciones en un medio que contenía ^{15}N y después transfirieron las células a un medio que contenía ^{14}N durante (**b**) uno o (**c**) dos ciclos sucesivos de replicación. En cada caso, se extrajo el DNA de las células y se centrifugó en cloruro de cesio hasta su equilibrio, como se describe en la Figura 19.3. Los cultivos bacterianos se muestran a la izquierda, los gradientes de cloruro de cesio en el centro y los esquemas ilustrativos de las moléculas de DNA a la derecha. Las hebras azul oscuro contienen ^{15}N, mientras que las azules claras han sido sintetizadas con ^{14}N.

gero. Los resultados de este experimento confirmaron claramente el modelo propuesto. Después de un ciclo de replicación en un medio con ^{14}N, la centrifugación en cloruro de cesio reveló una única banda de DNA cuya densidad se encontraba exactamente a medio camino entre la del DNA-^{15}N y la del DNA-^{14}N (Figura 19.4b). Meselson y Stahl concluyeron que la hebra de DNA parental de doble hélice no se mantenía intacta en el proceso, ya que no observaron ninguna banda en la densidad esperada para la cadena pesada. Igualmente, la ausencia de una banda en la densidad esperada para la cadena ligera indicaba que ninguna molécula de DNA nueva estaba formada exclusivamente por nucleótidos incorporados de novo. En su lugar, parecía que una parte de cada molécula de DNA hija se sintetizaba de novo, mientras que la otra parte provenía de la molécula parental. De hecho, la densidad intermedia entre la densidad de DNA ^{15}N y la del DNA ^{14}N significaba que las moléculas de DNA híbridas tenían la mitad del parental y la otra mitad de nueva síntesis, justo lo que predecía el modelo semiconservativo de la replicación.

Se obtuvo una confirmación adicional de los datos obtenidos de aquellas células que se dejaron crecer durante generaciones posteriores en presencia de ^{14}N. Por ejemplo, después de un segundo ciclo de replicación, Meselson y Stahl observaron dos bandas idénticas, una a la densidad del híbrido del ciclo anterior y otra a la densidad del DNA-^{14}N puro (Figura 19.4c). Esto concuerda con el modo de replicación semiconservativo, como se ilustra en la figura.

Meselson y Stahl concluyeron a partir de estos descubrimientos «que el nitrógeno de la molécula de DNA se divide a partes iguales entre dos subunidades físicamente continuas; que, después de la duplicación, cada molécula hija recibe una de éstas; y que las subunidades se conservan a lo largo de muchas duplicaciones» (1958). Posteriormente, se necesitaron más experimentos para demostrar que las «subunidades físicamente continuas» en las que el DNA se dividía eran, de hecho, hebras independientes de DNA. Meselson y Stahl probaron esto calentando el híbrido de DNA $^{14}N/^{15}N$ con el fin de separar las dos cadenas, y mostrar a continuación que una de las cadenas tenía la densidad de una hebra que contuviese ^{15}N, y la otra la densidad de una cadena que contuviese ^{14}N. Mientras tanto, otros investigadores utilizaban marcadores radiactivos y autorradiografía en busca del proceso de replicación en los cromosomas de células eucariotas. Al final, resultó que Watson y Crick estaban en lo cierto: el DNA se replica semiconservativamente en todos los organismos.

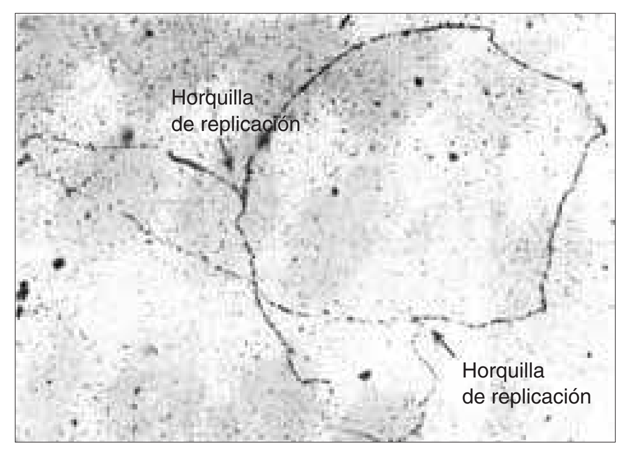
La replicación del DNA es, casi siempre, bidireccional

Los experimentos de Meselson y Stahl verificaron de una manera clara la idea de que durante la replicación del DNA, cada hebra de la doble hélice sirve como molde para la síntesis de una hebra complementaria nueva. A medida que los biólogos iban desvelando los detalles moleculares de este proceso, fue quedando claro, que la replicación del DNA es

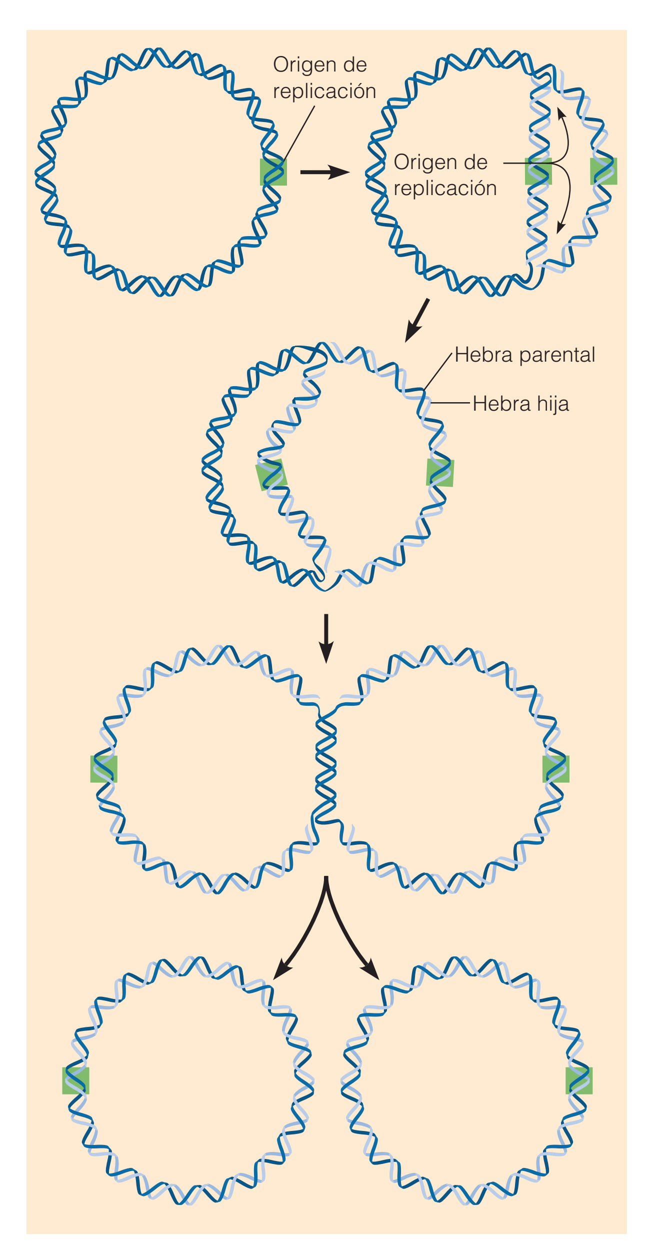
un proceso complejo en el que participan numerosas enzimas y otras proteínas, e incluso el RNA. Examinaremos en primer lugar los aspectos fundamentales de este mecanismo de replicación, y después nos centraremos en alguno de sus detalles moleculares. Para ello, mencionaremos con frecuencia a la bacteria *Escherichia coli*, en la que el mecanismo de replicación se conoce especialmente bien. No obstante, las investigaciones desarrolladas en algunos virus de mamíferos como SV40, y en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, han comenzado a desvelar los detalles de la replicación del DNA en los organismos eucariotas. La replicación del DNA parece ser un acto teatral cuya representación y sus actores moleculares son básicamente los mismos en las células procariotas y en las eucariotas. Esto no es sorprendente en un proceso tan fundamental, que debió surgir al principio de la evolución de la vida.

Los primeros experimentos en los que se logró visualizar directamente la replicación del DNA, fueron llevados a cabo por John Cairns. Cairns cultivó células de *E. coli* en un medio con el precursor del DNA, ^{3}H-timidina, durante varios periodos de tiempo, y después utilizó la autorradiografía para examinar las moléculas de DNA capturadas durante el acto de replicación. Una de estas moléculas se muestra en la Figura 19.5a. Las dos estructuras con forma de Y, señaladas con flechas, representan los sitios de la doble cadena en los que el DNA se está replicando. Estas **horquillas de replicación** se forman durante la duplicación, que comienza en un punto determinado del DNA y progresan a lo largo de él, desenrollando la hélice y copiando ambas cadenas a medida que avanzan. El sitio específico donde comienza la replicación contiene una secuencia de DNA especial denominada **origen de replicación**. Para comenzar la replicación, un grupo determinado de *proteínas iniciadoras* debe unirse al origen y, usando la energía proveniente de la hidrólisis del ATP, desenrollan la doble hélice para permitir el acceso de toda la maquinaria de replicación al DNA de cadena simple.

En la mayoría de los casos, la replicación del DNA se lleva a cabo desde el origen, de una manera bidireccional —es decir, se forman dos horquillas de replicación que se mueven en direcciones opuestas desde el origen—. En el DNA circular, este proceso se denomina *replicación theta*, porque se producen intermediarios que se asemejan a la letra griega theta (θ como se puede observar en la Figura 19.5b). Casi



(a) Autorradiografía de la replicación de *E.coli*



(b) Proceso de replicación del DNA circular

Figura 19.5 Replicación del DNA circular. (**a**) Esta autorradiografía muestra una molécula de DNA de *E. coli*, durante su replicación. La bacteria de la que proviene este DNA fue cultivada en un medio que contenía ^{3}H timidina, asegurándose de esta manera que la molécula pudiese ser vista mediante autorradiografía. (**b**) La replicación de la molécula de DNA circular comienza en un único origen y avanza bidireccionalmente alrededor del círculo, con los dos orígenes de replicación moviéndose en direcciones opuestas. Las nuevas hebras se muestran en azul claro. El proceso de replicación genera intermediarios que se asemejan a la letra griega theta (θ), de la que toma el nombre este tipo de replicación.

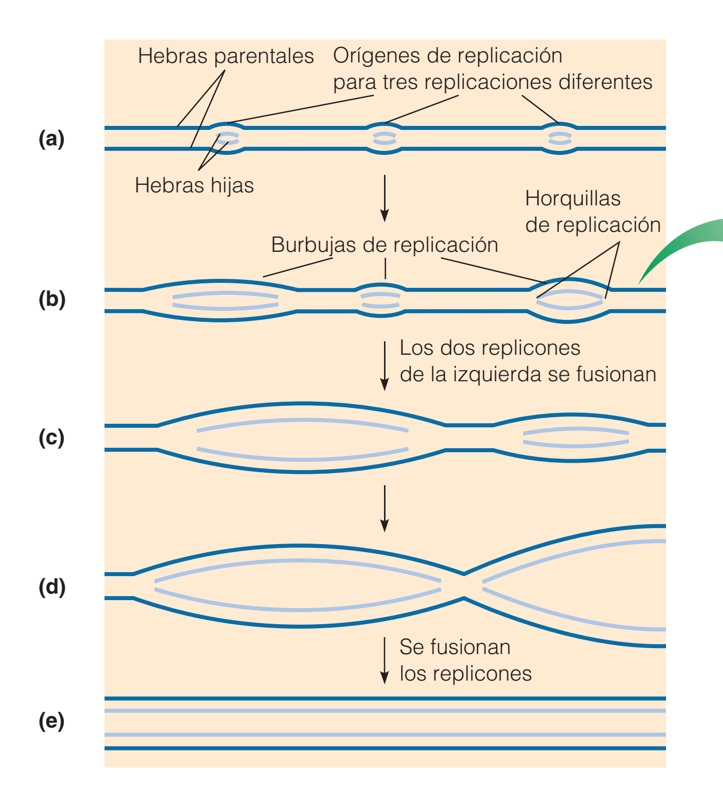
todas las moléculas de DNA circular se replican de esta manera, comenzando en un origen único. La replicación theta no sólo tiene lugar en los genomas bacterianos como *E. coli*, sino también en el DNA circular de las mitocondrias, los cloroplastos, los plásmidos y algunos virus. Al final de un ciclo de replicación theta, los dos DNA circulares permanecen unidos y se requiere la acción de la topoisomerasa (página 569) para separar los dos círculos.

En la replicación del DNA eucariota intervienen muchos replicones

A diferencia de lo que sucede en los cromosomas circulares bacterianos, en los cuales la replicación del DNA se inicia en un único origen, la replicación del DNA lineal de los cromosomas eucariotas se inicia en muchos sitios, formándose múltiples unidades de replicación conocidas como **replicones** (Figura 19.6). El DNA de un cromosoma eucariota típico puede contener varios centenares de replicones, cada uno con una longitud de 50.000-300.000 pares de bases. En el centro de cada replicón se encuentra un origen de replicación donde la síntesis de DNA se inicia por un proceso en el que participan varios grupos de proteínas iniciadoras. En primer lugar, se une al origen un complejo multiproteico conocido como *Complejo de Reconocimiento de Origen (ORC)*. El siguiente componente que se une es el *complejo MCM*, que contiene varias enzimas denominadas *helicasas del DNA*, que facilitan la replicación del DNA, desenrollándolo. Para el reclutamiento del complejo MCM al sitio de origen, se requiere un tercer grupo de proteínas, conocido como *cargadores de helicasas*, que median la unión de las proteínas del MCM al ORC. En este momento, el grupo completo de proteínas unidas al DNA se denomina **complejo de pre-replicación** y se dice que el DNA está «autorizado» para replicarse. Sin embargo, la replicación no comienza hasta que se incorporan varias proteínas adicionales, incluidas las enzimas que catalizan la síntesis del DNA.

Las secuencias del DNA que funcionan como orígenes de replicación presentan una gran variabilidad en los eucariotas. Dichas secuencias se identificaron por primera vez en levaduras (*S. cerevisiae*), aislando fragmentos de DNA e insertándolos en otras moléculas de DNA, que no eran capaces de replicarse. El fragmento de DNA insertado se denominó *secuencia de replicación autónoma* o *ARS*, cuando confería a la molécula la capacidad de replicarse en la levadura. El número de elementos ARS que se han detectado en los cromosomas de las levaduras normales es parecido al número total de replicones, lo que sugiere que los elementos ARS funcionan como orígenes de replicación.

Los elementos ARS de *S. cerevisiae* tienen una longitud de 100-150 pares de bases y contienen una secuencia central común de 11 nucleótidos, formada principalmente por pares AT, flanqueada por secuencias auxiliares que contienen regiones adicionales ricas en AT. Debido a que la doble hélice de DNA debe desenrollarse cuando se inicia la replicación, la presencia de tantos pares de bases AT en los orígenes de replicación es muy útil, ya que las bases AT están unidas por dos puentes de hidrógeno, y son más fáciles de romper que los pares de bases GC, que se unen mediante



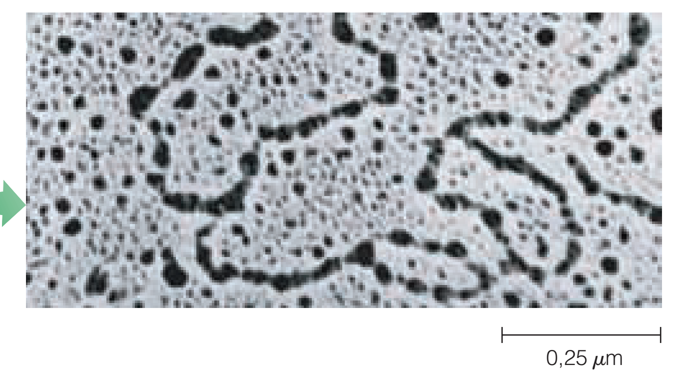


Figura 19.6 Replicones múltiples en el DNA eucariota. La replicación del DNA lineal eucariota se inicia en varios orígenes a lo largo del DNA; la coordinación de la iniciación es específica para cada agrupación de orígenes. (**a**) Las burbujas de replicación se forman en los orígenes. (**b**) Las burbujas crecen a medida que la horquilla de replicación se mueve a lo largo del DNA en ambas direcciones, a partir de cada origen. La micrografía muestra tres burbujas de replicación en el DNA de células de hámster en cultivo (TEM). (**c**) Al final, las burbujas de replicación se encuentran y se unen, (**d**) dando lugar a una estructura en forma de Y, cuando una burbuja de replicación llega al final de una molécula de DNA. (**e**) Cuando se han fusionado todas las burbujas, la replicación finaliza, y las dos moléculas hijas se separan.

tres puentes de hidrógeno. Los orígenes de replicación de los organismos pluricelulares eucariotas son generalmente más grandes y variables que los elementos ARS de *S. cerevisiae*, pero también contienen regiones que son ricas en AT.

Después de que se haya iniciado la síntesis del DNA en un origen de replicación, las dos horquillas de replicación continúan la síntesis en direcciones opuestas desde el origen, formando una «burbuja de replicación», que aumenta de tamaño a medida que avanza en ambas direcciones (Figura 19.6). Cuando la burbuja de replicación creciente de un replicón se encuentra con la burbuja de un replicón adyacente, se une el DNA sintetizado por cada replicón. De esta manera, el DNA sintetizado en varios sitios de replicación se une finalmente para formar dos moléculas hijas de doble hebra, cada una de las cuales tiene una hebra parental y otra de nueva síntesis.

¿Por qué la replicación del DNA en eucariotas posee varios sitios de replicación y en los procariotas no? Dado que los cromosomas eucariotas contienen más DNA que los bacterianos, les llevaría mucho más tiempo replicar sus cromosomas en el caso de que la síntesis de DNA se iniciase desde un único origen de replicación. Es más, la tasa a la que la horquilla de replicación sintetiza DNA en eucariotas es menor que en bacterias (presumiblemente porque la presencia de nucleosomas frena el proceso de replicación). La medida de la longitud de DNA radiactivo sintetizado por células expuestas a ^{3}H timidina durante periodos variables de tiempo, ha mostrado que la horquilla de replicación de los eucariotas sintetiza DNA con una tasa de 2.000 pares de bases por minuto, en comparación con los 50.000 pares de bases por minuto de las bacterias. Como un cromosoma humano medio contiene cerca de 10^{8} pares de bases, ¡se tardaría más de un mes en replicar un cromosoma en el caso de que sólo tuviese un origen de replicación!

La relación entre la velocidad de replicación de un cromosoma y el número de replicones queda reflejada perfectamente si se comparan las tasas de síntesis de DNA de células embrionarias y células adultas de la mosca de la fruta *Drosophila.* Durante el desarrollo del embrión, cuando la división celular debe de tener lugar muy rápidamente, las células embrionarias utilizan simultáneamente un gran número de replicones activos que poseen sólo unos cientos de pares de bases de longitud. Como consecuencia, el DNA se replica muy rápidamente y la fase S sólo dura unos minutos. Las células adultas, por su parte, emplean menos replicones espaciados a intervalos de decenas, centenares o millares de pares de bases, haciendo que la fase S tarde casi 10 horas en completarse. Ya que la tasa de síntesis de DNA en cualquier horquilla de replicación es prácticamente la misma en las células embrionarias y en las adultas, está claro que la duración de la fase S viene determinada por el número de replicones y la frecuencia con la que son activados, y no por la velocidad a la que cada replicón sintetiza DNA.

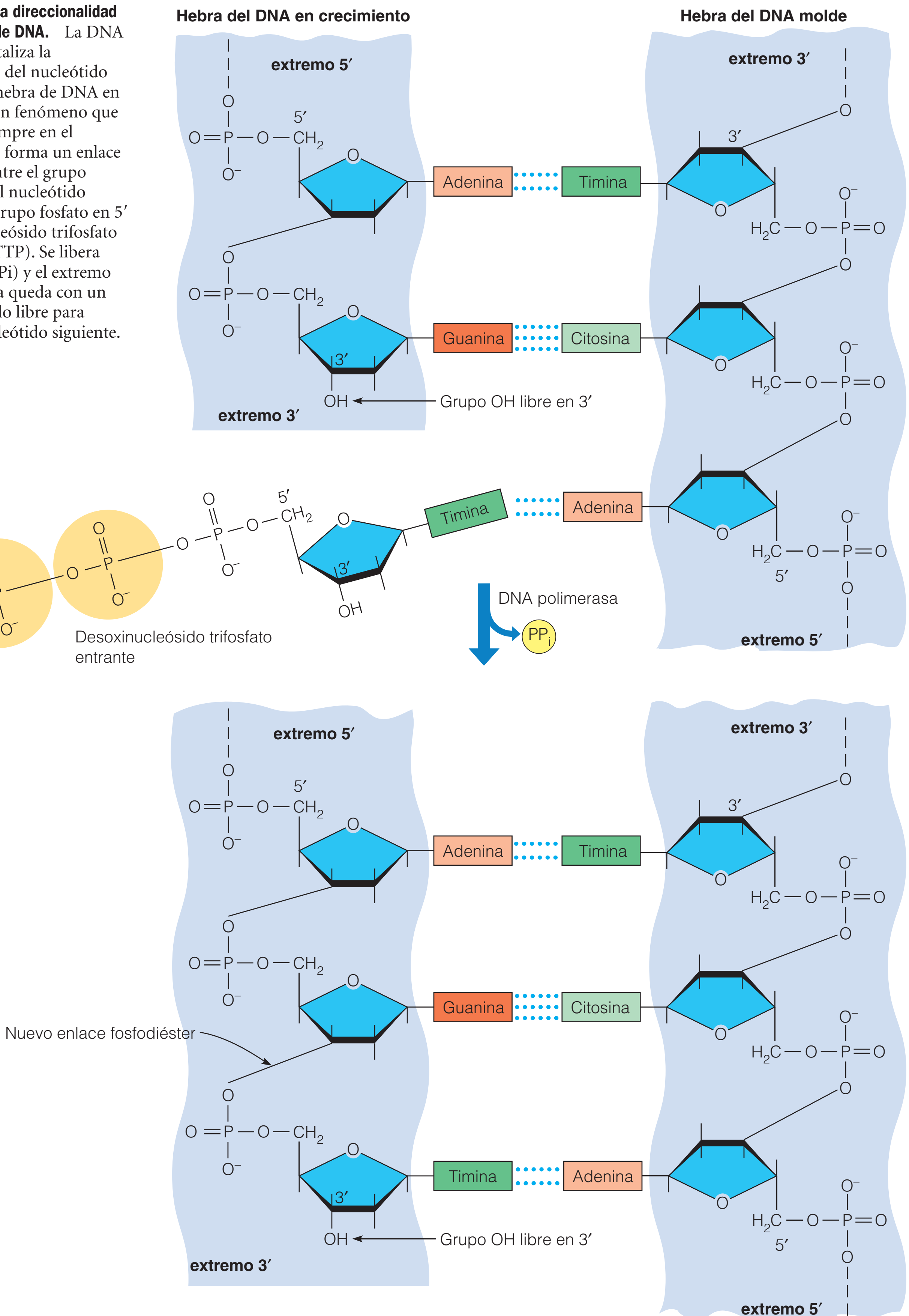
Los replicones no se activan todos al mismo tiempo durante la fase S del ciclo celular de una célula eucariota típica. En vez de eso, ciertos grupos de replicones suelen replicarse al inicio de la fase S, mientras que otros lo hacen más tarde. La información relacionada con el orden en el que los replicones son activados, se obtuvo de experimentos en los que se incubaron células en diferentes momentos de la fase S, con *5-bromodeoxiuridina* (*BrdU*), una sustancia que se incorpora al DNA en lugar de la timidina. El DNA marcado se puede separar del normal por centrifugación en equilibrio de gradiente de densidad, puesto que el DNA que tiene BrdU es más denso que el DNA normal. Después, se analiza el DNA marcado con BrdU mediante su hibridación con diferentes sondas específicas para determinados genes. Estos estudios han mostrado que los genes que se expresan activamente en un determinado tejido se replican en la fase S antes que los genes que están inactivos, que lo hacen más tarde durante la fase S. Si se analiza el mismo gen en dos tipos celulares, uno de los cuales tiene el gen activo y el otro no, se observa una replicación temprana sólo en el tipo celular en el que el gen se está transcribiendo.

Las DNA polimerasas catalizan la elongación de las cadenas de DNA

Cuando se propuso por primera vez el modelo de la replicación semiconservativa a principios de la década de 1950, los biólogos pensaron que el proceso de replicación era tan complejo, que sólo podía ser llevado a cabo en células intactas. Sin embargo, unos años más tarde, Arthur Kornberg descubrió que una enzima que había aislado de bacterias podía copiar moléculas de DNA en un tubo de ensayo. Esta enzima, a la que denominó **DNA polimerasa**, necesitaba una pequeña cantidad de DNA que actuase como molde. En presencia de dicho molde, la polimerasa catalizaba la elongación de las cadenas de DNA usando como sustratos a los derivados de los nucleósido trifosfato de las cuatro bases que componen el DNA (dATP, dTTP, dGTP y dCTP). A medida que estos sustratos se incorporan en la cadena de DNA recién formada, se liberan sus dos grupos fosfato terminales. Los desoxinucleósidos trifosfato son compuestos de alta energía cuya energía libre de hidrólisis es comparable a la del ATP, por lo que la energía liberada cuando estos enlaces fosfato se rompen, dirige lo que de otro modo sería una reacción de polimerización termodinámicamente desfavorable.

En la reacción de la DNA polimerasa, los nucleótidos entrantes están unidos covalentemente al extremo 3′ de la cadena de DNA en crecimiento. Cada nucleótido adicional está unido a la cadena en crecimiento por un enlace fosfodiéster entre el grupo fosfato de su carbono 5′ y el grupo hidroxilo del carbono 3′ del nucleótido que fue añadido en el paso anterior (Figura 19.7). En otras palabras, la elongación de la cadena tiene lugar en el extemo 3′ de una hebra de DNA, y se dice por lo tanto que la hebra crece en dirección $5' \rightarrow 3'$.

Figura 19.7 La direccionalidad de la síntesis de DNA. La DNA polimerasa cataliza la incorporación del nucleótido siguiente a la hebra de DNA en crecimiento, un fenómeno que tiene lugar siempre en el extremo 3′. Se forma un enlace fosfodiéster entre el grupo hidroxilo 3′ del nucleótido terminal y el grupo fosfato en 5′ del desoxinucleósido trifosfato (en este caso TTP). Se libera pirofosfato (PPi) y el extremo 3′ de la cadena queda con un grupo hidroxilo libre para aceptar el nucleótido siguiente.



Poco después del descubrimiento de Kornberg, se descubrieron otras DNA polimerasas en células procariotas y eucariotas (la Tabla 19.1 enumera las principales DNA polimerasas que se utilizan en la replicación del DNA, junto con otras proteínas clave del proceso). La enzima descubierta por Kornberg en *E. coli* resultó no ser la responsable de la replicación del DNA en células intactas. Este hecho fue descubierto cuando Peter DeLucia y John Cairns publicaron que ciertas cepas mutantes de la bacteria que no tenían la enzima de Kornberg, eran capaces de replicar su DNA y reproducirse normalmente. En ausencia de la enzima de Kornberg, era posible detectar varias enzimas de origen bacteriano que sintetizaban DNA. Estas otras enzimas se numeran usando números romanos (por ejemplo, DNA polimerasas II, III, IV y V) para distinguirlas de la enzima original de Kornberg, denominada DNA polimerasa I. Cuando se comparó por primera vez las tasas de replicación de varias DNA polimerasas en un tubo de ensayo, se encontró que sólo la DNA polimerasa III funcionaba lo suficientemente rápido para satisfacer la tasa de replicación de DNA de las células intactas, que incorpora como media 50.000 pares de bases por minuto en las bacterias.

Estas observaciones sugerían que la DNA polimerasa III es la enzima principal en la replicación del DNA de bacterias, pero la evidencia resultaría más convincente si se demostrase que las células que no tienen DNA polimerasa III son incapaces de replicar su DNA. ¿Cómo es posible cultivar y estudiar células que han perdido la habilidad de llevar a cabo una función tan esencial como es la replicación del DNA? Una estrategia muy acertada se basa en el empleo de **mutantes sensibles a la temperatura**, que son células que producen proteínas que funcionan adecuadamente a una temperatura normal, pero que sufren daños considerables cuando aumenta ligeramente la temperatura. Por ejemplo,

Tabla 19.1 Proteínas clave de replicación del DNA

Proteína	Tipo de célula	Principales actividades y funciones
DNA polimerasa I	Procariotas	Síntesis del DNA; exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ (actividad correctora); exonucleasa $5' \rightarrow 3'$; elimina y sustituye los cebadores de RNA que se usan en la replicación (también funciona en la reparación por escisión del DNA dañado)
DNA polimerasa III	Procariotas	Síntesis de DNA; exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ (actividad correctora); se utiliza en la síntesis de ambas cadenas
DNA polimerasa α (alfa)	Eucariotas	Síntesis del DNA nuclear; forma complejos con la primasa e inicia la síntesis de DNA en el extremo 3′ de los cebadores de RNA tanto en la cadena conductora como en la cadena retrasada (también participa en la reparación del DNA)
DNA polimerasa γ (gamma)	Eucariotas	Síntesis de DNA mitocondrial
DNA polimerasa δ (delta)	Eucariotas	Síntesis del DNA nuclear; exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ (actividad correctora); se cree que está implicada en la síntesis de las cadenas conductoras y retrasadas (también participa en la reparación del DNA)
DNA polimerasa ε (épsilon)	Eucariotas	Síntesis del DNA nuclear; exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ (actividad correctora); se cree que está implicada en la síntesis de las cadenas conductoras y retrasadas (también participa en la reparación del DNA)
Primasa	Ambas	Síntesis de RNA; fabrica los oligonucleótidos que se usan como cebadores para la síntesis de DNA
DNA helicasa	Ambas	Desenrolla el DNA de doble cadena
proteína de unión al DNA de cadena sencilla (SSB)	Ambas	Se une al DNA de cadena sencilla; mantiene extendidas las cadenas desenrolladas de DNA para facilitar el acceso de otras proteínas
DNA topoisomerasa (tipo I y tipo II)	Ambas	Realiza cortes en una cadena (tipo I) o en ambas cadenas (tipo II) del DNA; induce o reduce el sobrenrollamiento del DNA; puede actuar como un pivote para prevenir el sobrenrollamiento por delante de la horquilla de replicación; puede separar los círculos de DNA unidos al final de la replicación.
DNA girasa	Procariotas	DNA Topoisomerasa de tipo II que sirve como un pivote para evitar el sobreenrollamiento por delante de la horquilla de replicación en el DNA de *E. coli*.
DNA ligasa	Ambas	Cataliza la formación de enlaces covalentes entre hebras de DNA adyacentes, por ejemplo entre fragmentos de Okazaki en la síntesis de la cadena de DNA retrasada o entre los segmentos de DNA nuevos y viejos formados durante la reparación por escisión del DNA.
Proteínas inhibidoras	Ambas	Se unen al origen de replicación e inician el desenrollamiento de la doble hélice de DNA
Telomerasa	Eucariotas	Sintetiza DNA para extender los telómeros (secuencias terminales del DNA cromosómico) usando como molde una molécula de RNA integral.

se han aislado bacterias mutantes en las que la DNA polimerasa III funciona correctamente a 37 °C, pero que pierde su función cuando la temperatura se eleva a 42 °C. Estas bacterias crecen normalmente a 37 °C, pero pierden la capacidad de replicar su DNA cuando la temperatura alcanza los 42 °C, lo que indica que la DNA polimerasa III desempeña un papel crucial en el proceso normal de replicación.

A pesar de que las observaciones anteriores indican que la DNA polimerasa III es esencial para la replicación del DNA en bacterias, no es la única enzima implicada. Como veremos a continuación, se requieren muchas otras proteínas para la replicación del DNA, incluyendo la DNA polimerasa I. Los otros tipos principales de DNA polimerasa de las bacterias (II, III y IV) desempeñan un papel más especializado en fenómenos relacionados con la reparación del DNA, un proceso que se describirá con detalle más adelante en este capítulo.

Al igual que las bacterias, las células eucariotas disponen de varias DNA polimerasas. Hasta la fecha, se han identificado más de una docena de enzimas diferentes, cada una de ellas denominada con una letra griega distinta. Dentro de este grupo, las polimerasas α (alfa), δ (delta) y ε (épsilon) están implicadas en la replicación del DNA nuclear. La DNA polimerasa γ (gamma) se encuentra únicamente en la mitocondria y es la principal polimerasa usada en la replicación del DNA mitocondrial. La mayoría de las polimerasas eucariotas restantes participan, tanto en la reparación del DNA, como en la replicación entre las regiones de DNA dañado.

Aparte de su función biológica en el interior de la célula, las DNA polimerasas tienen una gran aplicación práctica en el campo de la biotecnología. El Anexo 19A describe una técnica denominada reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la que la principal herramienta es una DNA polimerasa. Utilizada para la amplificación rápida de pequeñas muestras de DNA, la PCR representa un complemento muy útil para el método de huella genética que se discutió en el Capítulo 18.

En la síntesis de DNA se forman segmentos discontinuos que se ensamblan por medio de la DNA ligasa

El descubrimiento de la DNA polimerasa constituyó el primer paso en la elucidación del mecanismo de replicación del DNA. Uno de los primeros problemas conceptuales surgió del descubrimiento de que *las DNA polimerasas sólo pueden catalizar la incorporación de nucleótidos al extremo 3′ de una cadena de DNA existente*; en otras palabras, las DNA polimerasas sintetizan DNA en la dirección $5' \rightarrow 3'$ exclusivamente. Por lo tanto, las dos hebras de la doble hélice de DNA corren en direcciones opuestas. Así que, ¿cómo puede una enzima que sólo funciona en la dirección $5' \rightarrow 3'$ sintetizar ambas hebras de DNA en una horquilla de replicación, cuando sólo una de las cadenas discurre en dirección $5' \rightarrow 3'$, y la otra lo hace en dirección $3' \rightarrow 5'$?

La solución a este problema fue propuesta en 1968 por Reiji Okazaki, cuyos experimentos sugirieron que el DNA se sintetiza en pequeños fragmentos que se unen posteriormente. Okazaki aisló el DNA de bacterias que habían sido expuestas brevemente a un sustrato radiactivo que se incorporaba a las hebras de DNA de nueva síntesis. El examen de este DNA reveló que gran parte de la radiactividad se localizaba en pequeños fragmentos de DNA con una longitud de unos miles de nucleótidos (Figura 19.8a). Después de exposiciones más prolongadas, la radiactividad se encontraba asociada a moléculas más grandes. Estos resultados llevaron a Okazaki a pensar que los fragmentos más pequeños de DNA, conocidos hoy en día como **fragmentos de Okazaki**, son los precursores de moléculas de DNA más largas de nueva formación. En investigaciones posteriores se puso de manifiesto, que la conversión de los fragmentos de Okazaki en moléculas de DNA más grandes, no tenía lugar en bacterias mutantes que no tenían la enzima **DNA ligasa**, que une los fragmentos de DNA, catalizando la formación de un enlace fosfodiéster dependiente de ATP, entre el extremo 3′ de una cadena de nucleótidos y el extremo 5′ de otra (Figura 19.8b).

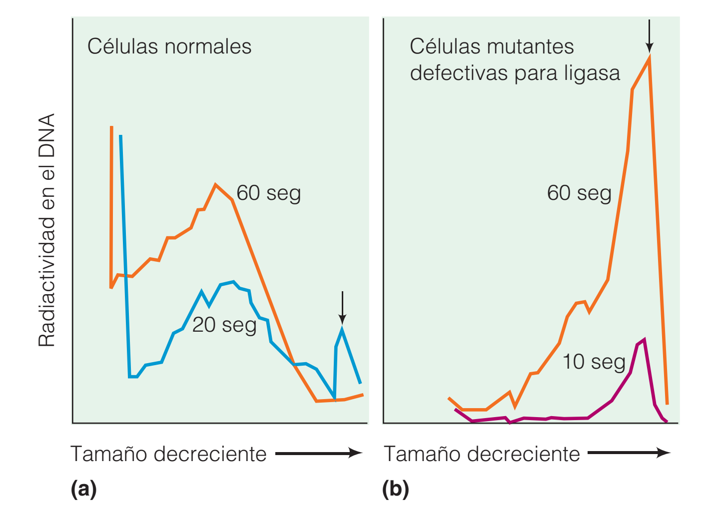


Figura 19.8 Resumen de los experimentos de Okazaki sobre el mecanismo de replicación en las bacterias. (**a**) Se incubaron las bacterias durante breves periodos de tiempo con timidina radiactiva con el fin de marcar el DNA sintetizado de novo. Posteriormente se aisló el DNA, disociado en sus hebras y separado mediante centrifugación, en moléculas de diferente tamaño. En las bacterias incubadas con ^{3}H timidina durante 20 segundos, se encuentra una cantidad de radiactividad significativa en pequeños fragmentos de DNA (flecha). A 60 segundos, la radiactividad presente en los fragmentos pequeños ha pasado a moléculas de DNA de mayor tamaño. (**b**) En las bacterias mutantes, que no tienen la enzima DNA ligasa, la radiactividad permanece en los fragmentos pequeños de DNA, incluso después de 60 segundos de incubación. Se concluyó por lo tanto, que la DNA ligasa funciona uniendo los pequeños fragmentos de DNA en cadenas más largas.

La revolución de la PCR

La posibilidad de trabajar con cantidades ínfimas de DNA resulta muy útil en muchas disciplinas, desde la paleontología a la criminología. En el Capítulo 18 hemos visto cómo el análisis de la huella genética del DNA se puede usar para la identificación y estudio de secuencias específicas de muestras tan pequeñas como 1 μg de DNA, la cantidad que se obtiene de una pequeña gota de sangre (*véase* Anexo 18C). Pero en muchas ocasiones no se dispone siquiera de esa pequeña cantidad de DNA. En estos casos, otra técnica, conocida como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), soluciona el problema. Con la PCR, es posible replicar, o *amplificar*, fragmentos de DNA específicos que se encuentran inicialmente en cantidades extremadamente pequeñas. En sólo unas pocas horas, la PCR puede realizar millones o incluso miles de millones de copias de una secuencia determinada de DNA, produciendo de esta manera material suficiente para poder utilizar la técnica de la huella genética del DNA, para secuenciar el DNA, o para otros usos. Al igual que la técnica de la huella genética, la PCR se cita en las noticias, con relación a la resolución de crímenes violentos.

En la PCR, no es necesario el complejo sistema multiproteico que la célula utiliza para replicar el DNA; no se requieren ni orígenes de replicación, ni proteínas desenrolladoras del DNA, ni el mecanismo para la síntesis de la cadena retrasada. Las claves que hacen de la PCR una técnica muy simple, son una DNA polimerasa poco habitual y unos cebadores sintéticos que pueden producir una reacción en cadena, que tiene como resultado un crecimiento exponencial de unas moléculas de DNA específicas. El bioquímico Kary Mullis recibió el Premio Nobel por este descubrimiento.

Para poder realizar una PCR es necesario conocer parte de la secuencia de bases del fragmento de DNA que se quiere amplificar. Utilizando esta información, se sintetizan cebadores cortos de cadena simple; estos cebadores tienen una longitud de 15-20 nucleótidos y están formados por secuencias que son complementarias a las secuencias situadas en los extremos del segmento de DNA que se quiere amplificar (si no se conocen las secuencias que flanquean la secuencia de interés, es posible unir otras artificiales antes de llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa). Posteriormente se añade la DNA polimerasa para sintetizar las cadenas de DNA complementarias, utilizando como puntos de inicio los dos cebadores. La DNA polimerasa que se usa habitualmente para este propósito se aisló de la bacteria *Thermus aquaticus*, un habitante de aguas termales que tienen un temperatura habitual de 70-80 °C. La temperatura óptima de esta enzima, denominada *Taq* polimerasa, es de

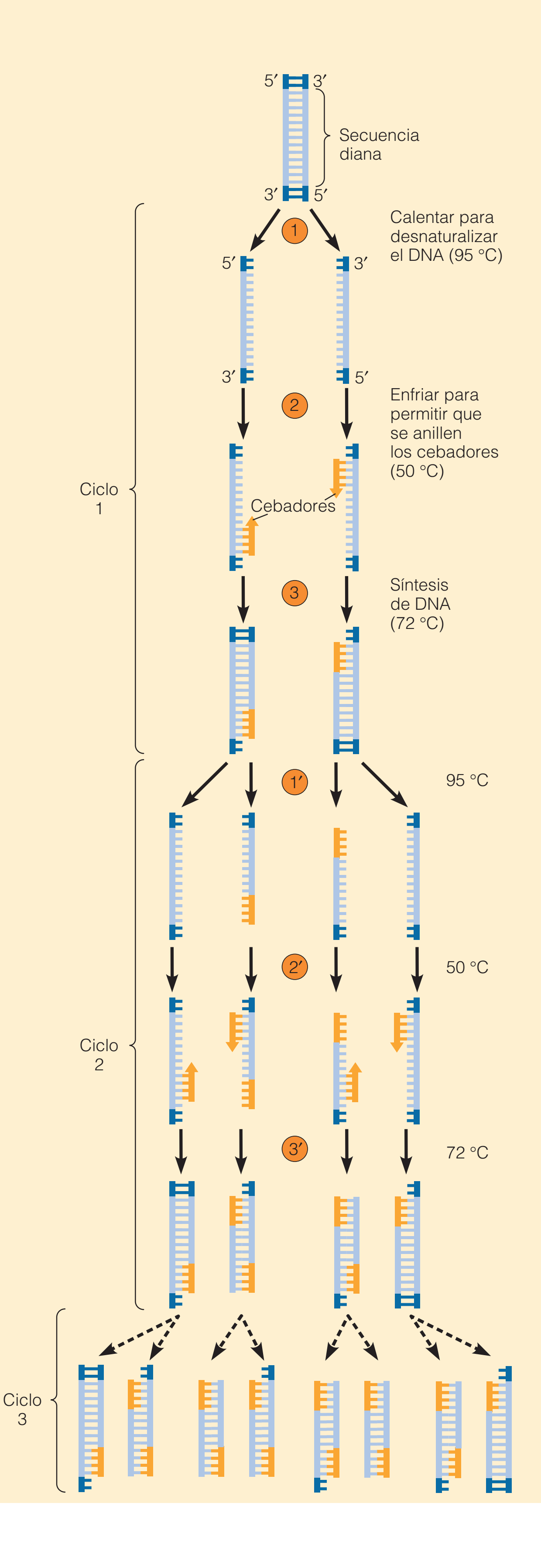


Figura 19A.1 Amplificación del DNA utilizando la reacción en cadena de la polimerasa. Véase la descripción en el texto de la caja. La PCR funciona mejor cuando el fragmento de DNA que se quiere amplificar —la región que flanquean los dos cebadores— tiene una longitud de 50-2.000 nucleótidos. La temperatura de enfriamiento que se utiliza para permitir que los cebadores se unan, aquí 50 °C, puede variar en función de la temperatura de hibridación particular del cebador que se use.

72 °C, y es estable incluso a temperaturas superiores, una propiedad que hace posible la automatización de la PCR.

El modo de funcionamiento de la PCR se resume en la Figura 19.1A. Los componentes de la mezcla inicial son el DNA que contiene la secuencia que se quiere amplificar, la *Taq* polimerasa, los cebadores sintéticos de DNA y los cuatro desoxinucleótidos fosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP). Cada ciclo de la reacción comienza con un breve periodo de calentamiento próximo a la ebullición (95°C) para desnaturalizar la doble hélice de DNA en dos cadenas (①). La solución se enfría después para permitir la unión de los cebadores a las regiones del DNA de las que sean complementarias (②). Seguidamente, la temperatura se eleva hasta 72 °C y la *Taq* polimerasa comienza a trabajar, añadiendo nucleótidos al extremo 3′ del cebador (③). La especificidad de los cebadores asegura la copia de tan sólo el fragmento de DNA situado por detrás de los cebadores. La *taq* polimerasa no tarda más de unos pocos minutos en copiar la secuencia completa del DNA que se quiere amplificar, y consigue duplicar de esta manera la cantidad del mismo (①′-③′).

Este ciclo de reacciones se repite tantas veces como sea necesario, duplicándose en cada ciclo la cantidad de DNA que hubiese en el ciclo anterior. A partir del tercer ciclo empieza a aparecer una cantidad apreciable de un DNA de longitud uniforme, cuya secuencia es la de la diana (como es el caso de las moléculas tercera y sexta de la última línea de la figura). Ya que la *Taq* polimerasa no se destruye con el calentamiento a 95 °C, no es necesario añadir enzima nueva en cada ciclo. En la mayoría de los casos, son suficientes 20-30 ciclos para producir la cantidad deseada de DNA. La amplificación teórica que se consigue después de *n* ciclos es 2^n, así que tras de 20 ciclos de amplificación, se obtiene más de un millón de copias ($2^{20} = 1.048.576$) y después de 30 ciclos más de mil millones ($2^{30} = 1.073.741.824$). Teniendo en cuenta que cada ciclo dura menos de 5 minutos, se pueden producir varios cientos de miles de millones de copias de la secuencia de DNA original, en pocas horas. Esto es considerablemente más rápido que el tiempo que se requiere para amplificar el DNA a través de la clonación en una bacteria, un método que se tratará en el Capítulo 20. Además, la PCR se puede aplicar con tan poca cantidad de DNA como una sola molécula, y no se precisa una muestra de DNA inicial purificada, ya que los cebadores seleccionan la región del DNA que será amplificada.

La PCR, por tanto, hace posible identificar a una persona a partir de la minúscula cantidad de DNA que deja en un objeto tras tocarlo, tras dejar sin saberlo, unas pocas células cutáneas. Utilizando la técnica de la PCR para amplificar la cantidad de DNA de una muestra, seguida del análisis de la huella genética del DNA amplificado, ¡es posible obtener una huella genética del DNA de una persona a partir de sus propias huellas digitales! A pesar de que estas técnicas tienen un enorme potencial en la resolución de los crímenes, su extraordinaria sensibilidad puede causar problemas. Unas pocas moléculas de DNA contaminantes (como, por ejemplo, las células cutáneas desprendidas de un técnico de laboratorio), pueden amplificarse junto con el DNA de interés y producir resultados falsos. En un caso legal, un error de este tipo puede causar una gran injusticia, por lo que, los tribunales están procediendo con cautela a la hora de admitir como prueba los resultados de una PCR.

No obstante, con precaución y los controles adecuados, la PCR se está revelando como una herramienta extremadamente valiosa. Se ha utilizado como método auxiliar en la investigación de la evolución, para amplificar fragmentos de DNA obtenidos de momias egipcias, de una polilla de hace 40.000 años congelada en un glaciar, y de un vegetal fósil de hace 30.000 años. En el campo de la medicina, la PCR se usa en el diagnóstico prenatal rápido de células embrionarias, y ha hecho posible la detección de genes víricos en células infectadas con VIH u otros virus. Pero puede que la aportación más importante de la PCR sea en el campo de la investigación básica, donde ha revolucionado la genética molecular permitiendo la amplificación sencilla de determinados genes o de secuencias de los miles de genes del genoma humano.

Las observaciones anteriores encajan con un modelo de replicación del DNA en el que la DNA polimerasa sólo sintetiza DNA en la dirección 5′ ⟶ 3′. Según este modelo, la síntesis en la horquilla de replicación es *continua* para una hebra, en la dirección del movimiento de la horquilla de replicación, pero *discontinua* para la otra hebra en la dirección contraria (Figura 19.9). De esta manera, las dos hebras hijas se pueden diferenciar por su modo de crecimiento. Una de las dos hebras nuevas, denominada **cadena conductora**, se sintetiza de una manera continua porque crece en la dirección 5′ ⟶ 3′. La otra hebra de nueva formación, denominada **cadena retrasada**, debe crecer en la dirección 3′ ⟶ 5′, ya que las dos cadenas de DNA están orientadas de manera opuesta. Como la DNA polimerasa no es capaz de incorporar nucleótidos en la dirección 3′ ⟶ 5′, la hebra retrasada se forma como una serie de pequeños fragmentos de Okazaki discontinuos, que se sintetizan en la dirección 5′ ⟶ 3′. Estos fragmentos se juntan mediante una DNA ligasa para fabricar una nueva hebra continua de DNA 3′ ⟶ 5′. Los fragmentos de Okazaki tienen una longitud de unos 1.000-2.000 nucleótidos en sistemas bacterianos y virales, pero sólo de diez en células eucariotas. En *E. coli*, se utiliza la misma polimerasa, la polimerasa III, para sintetizar, tanto los fragmentos de Okazaki de la cadena retrasada, como la cadena conductora completa. En los eucariotas, se cree que las DNA polimerasas δ y ε están implicadas en la síntesis de ambas cadenas, la conductora y la retrasada.

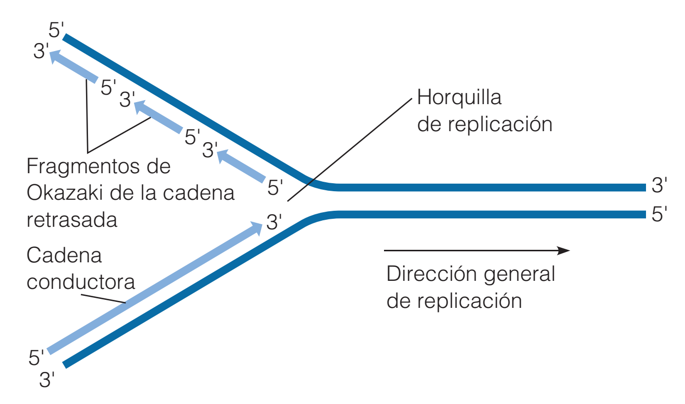


Figura 19.9. Direcciones de síntesis de DNA en la horquilla de replicación. Debido a que las DNA polimerasas únicamente sintetizan las cadenas de DNA en la dirección 5′ ⟶ 3′, la síntesis en la horquilla de replicación es continua en la dirección del movimiento de la horquilla de replicación para la hebra conductora, pero discontinua en la dirección contraria para la hebra retrasada. La síntesis discontinua implica la formación de pequeños intermediarios denominados fragmentos de Okazaki, que tienen una longitud de 1.000-2.000 nucleótidos en las bacterias, y de 100-200 nucleótidos en las células eucariotas. Los fragmentos son unidos posteriormente por la enzima DNA ligasa. El DNA parental se muestra en azul oscuro, y la hebra de nueva formación en azul claro. En ésta y en figuras posteriores, las cabezas de flecha indican la dirección en la que la cadena de ácidos nucleicos está siendo elongada.

La actividad exonucleasa 3′ ⟶ 5′ de la DNA polimerasa es responsable del control de calidad

En vista de la complejidad del modelo anterior, cabe plantearse la pregunta de por qué las células no han desarrollado simplemente una enzima que sintetice DNA en la dirección 3′ ⟶ 5′. Una posible respuesta se encuentra en la necesidad de corregir los errores durante la replicación del DNA. Alrededor de 1 de cada 100.000 nucleótidos que se incorporan durante la replicación del DNA no está apareado correctamente con la hebra molde del DNA. Estos errores se reparan habitualmente gracias a un mecanismo **corrector de errores de apareamiento,** en el que actúan las mismas moléculas de DNA polimerasa que catalizan la síntesis de DNA. La corrección de errores de apareamiento es posible debido a que además de catalizar la síntesis de DNA, casi todas las DNA polimerasas muestran actividad exonucleasa 3′ ⟶ 5′. Una **exonucleasa** es una enzima que degrada ácidos nucleicos (normalmente DNA) desde un extremo, a diferencia de las endonucleasas, que realizar cortes internos. Una exonucleasa 3′ ⟶ 5′ es aquella que corta los nucleótidos desde el extremo 3′ de una cadena de nucleótidos. Por lo tanto, la actividad exonucleasa 3′ ⟶ 5′ de la DNA polimerasa le permite retirar los nucleótidos incorrectamente incorporados desde el extremo 3′ de una cadena de DNA en crecimiento (Figura 19.10). Esta capacidad de retirar los nucleótidos incorrectos puede mejorar la fidelidad de la replicación del DNA, dejándola en sólo unos pocos errores por cada mil millones de pares de bases replicadas.

Si las células tuviesen una enzima capaz de sintetizar DNA en la dirección 3′ ⟶ 5′, no sería posible la corrección de errores de apareamiento, ya que la cadena de DNA en crecimiento poseería un nucleótido trifosfato en su extremo 5′. Si el nucleótido en 5′ fuese una base incorrecta que necesitase ser eliminada, su retirada eliminaría también el grupo trifosfato que proporciona la energía libre que permite a la DNA polimerasa incorporar nucleótidos a la cadena de DNA en crecimiento, y por lo tanto la cadena no podría elongarse posteriormente.

La replicación del DNA se inicia con cebadores de RNA

Si la DNA polimerasa sólo puede incorporar nucleótidos a una cadena de nucleótidos preexistente, ¿cómo se inicia la replicación en una doble hélice de DNA? Poco después de que se descubriesen los fragmentos de Okazaki, los investigadores propusieron la implicación del RNA en el proceso de iniciación, tras las siguientes observaciones: (1) los fragmentos de Okazaki con frecuencia presentan fragmentos de RNA, con una longitud entre 3 y 10 bases, en su extremos 5′. (2) La DNA polimerasa pueden catalizar la incorporación de nucleótidos al extremo 3` tanto de cadenas de RNA como de DNA. (3) Las células poseen una enzima denominada **primasa** que sintetiza fragmentos de RNA de una longitud aproximada de 10 bases utilizando como molde el DNA, y (4) a diferencia de la DNA polimerasa, que sólo in-

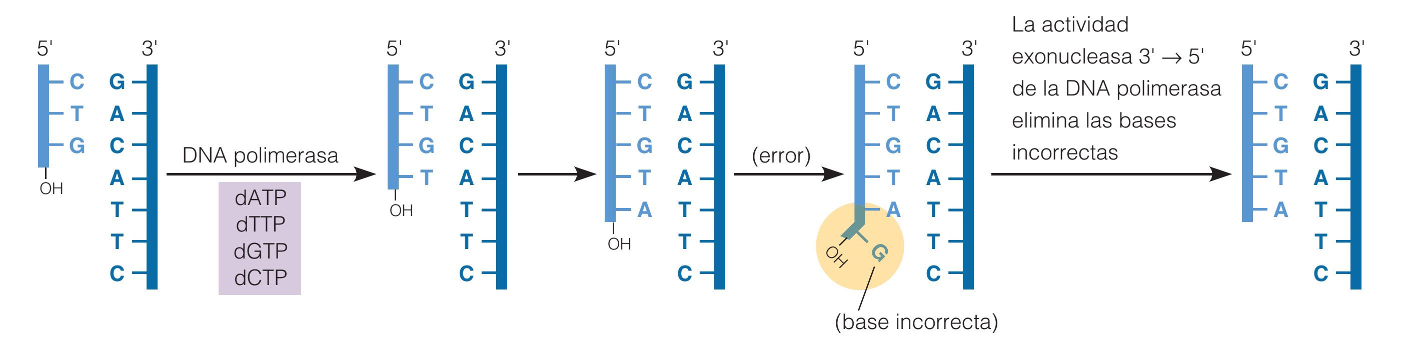


Figura 19.10 Corrección de errores de apareamiento por la exonucleasa 3′ ⟶ 5′. Si se inserta una base incorrecta durante la replicación del DNA, la actividad exonucleasa 3′ ⟶ 5′ de la DNA polimerasa cataliza su eliminación, de manera que pueda insertarse la base correcta.

corpora nucleótidos en los extremos de cadenas preexistentes, la primasa puede iniciar la síntesis de RNA desde cero uniendo dos nucleótidos.

Estas observaciones condujeron a la conclusión de que la síntesis de DNA se inicia través de la formación de pequeños **cebadores de RNA**. La primasa sintetiza los cebadores de RNA, utilizando una única cadena de DNA, como molde para guiar la síntesis de un fragmento complementario de RNA (Figura 19.11, ①). La primasa es un tipo especial de RNA polimerasa, que participa únicamente en la replicación del DNA. Como las demás RNA polimerasas, y a diferencia de las DNA polimerasas, las primasas pueden *iniciar* la síntesis de una cadena de nucleótidos nueva, complementaria a una cadena molde, sin la necesidad de un cebador.

La primasa de *E. coli* es prácticamente inactiva a menos que esté acompañada de otras seis proteínas, formando un complejo llamado **primosoma**. Las otras proteínas del primosoma tienen la función de desenrollar el DNA parental y de reconocer las secuencias de DNA diana donde debe iniciarse la replicación. La situación en eucariotas es ligeramente diferente, por lo que no se usa el término *primosoma*. La primasa de eucariotas no está asociada de manera tan íntima a proteínas desenrollantes, sino que está estrechamente unida a la DNA polimerasa α, que es la principal polimerasa implicada en la iniciación de la replicación del DNA.

Una vez que se ha fabricado un cebador de RNA, puede comenzar la síntesis del DNA, y la DNA polimerasa III (o la DNA polimerasa α, seguida por la DNA polimerasa δ en eucariotas) comienza a incorporar, sucesivamente, desoxinucleótidos al extremo 3′ del cebador (Figura 19.11, ②). En el caso de la hebra conductora, la iniciación a través de un cebador de RNA sólo tiene lugar una única vez, después de que se haya formado la horquilla de replicación; la DNA polimerasa puede incorporar nucleótidos en la dirección 5′ ⟶ 3′ d una manera continua. Por su parte, la hebra retrasada se sintetiza como una serie de fragmentos de Okazaki discontinuos, cada uno de los cuales necesita ser iniciado por un cebador diferente. Para cada cebador, la DNA polimerasa III incorpora nucleótidos hasta que el fragmento en crecimiento alcanza el fragmento de Okazaki adyacente. En este punto, ya no es necesario el fragmento de RNA y se elimina. Para rellenar el espacio que deja, se sintetizan nucleótidos de DNA. Los cebadores de RNA en *E. coli* se eliminan por la actividad exonucleasa 5′ ⟶ 3′ de la DNA polimerasa I (que es diferente de la actividad exonucleasa 3′ ⟶ 5′ correctora). Al mismo tiempo, la DNA polimerasa I sintetiza DNA en la dirección 5′ ⟶ 3′ habitual para rellenar los huecos resultantes (Figura 19.11, ③). Los fragmentos adyacentes se unen posteriormente a través de una DNA ligasa.

¿Por qué las células usan cebadores de RNA que deben ser eliminados posteriormente en vez de usar simplemente un cebador de DNA desde el principio? De nuevo, la pregunta se responde por la necesidad de la corrección de errores. Ya hemos visto que la DNA polimerasa posee una actividad exonucleasa dirección 3′ ⟶ 5′ que le permite eliminar los nucleótidos que no sean correctos del extremo 3′ de una cadena de DNA. De hecho, la DNA polimerasa únicamente elongará una cadena de DNA si el nucléotido que se encuentra en el extremo 3′ está correctamente apareado. Pero una enzima que *inicia* la síntesis de una nueva cadena no puede llevar a cabo dicha función correctora, porque no se trata de unir un nucleótido a un extremo con bases apareadas preexistente. Como consecuencia, las enzimas que inician la síntesis de ácidos nucleicos no son muy buenas co-

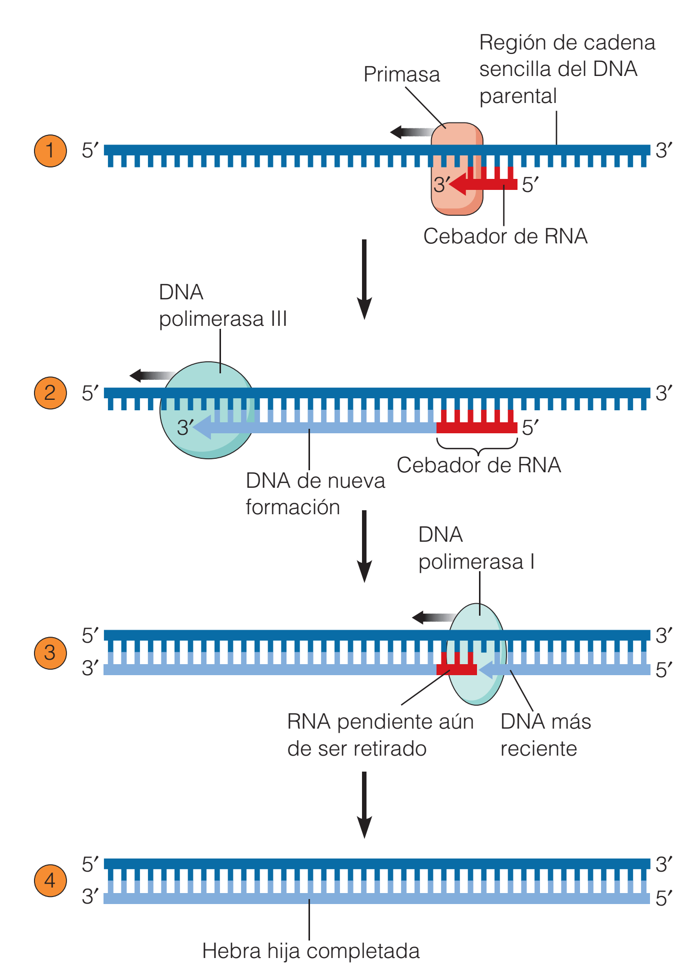


Figura 19.11 Función de los cebadores de RNA en la replicación del DNA. La síntesis de DNA se inicia con un cebador pequeño de RNA tanto en procariotas como en eucariotas. Esta figura muestra el proceso tal y como sucede en la hebra retrasada en *E. coli.* ① El cebador (rojo) es sintetizado por la primasa, una polimerasa de RNA que utiliza una hebra de DNA como molde. En *E. coli*, la primasa forma parte de un complejo proteico denominado primosoma (no se muestra). ② Una vez que ya se dispone del pequeño fragmento de RNA, la DNA polimerasa lo utiliza como cebador para iniciar la síntesis de DNA, que tiene lugar en la dirección 5′ ⟶ 3′. ③ Los cebadores de RNA son eliminados al final por la actividad exonucleasa 5′ ⟶ 3′ de la DNA polimerasa I, que cambia los ribonucleótidos por desoxirribonucleótidos. ④ La cadena hija se completa a través de la unión por la DNA ligasa.

rrigiendo errores. Utilizando RNA en vez de DNA para comenzar la síntesis, las células se aseguran que cualquier base incorrecta que se inserte durante la iniciación se encuentra restringida a las secuencias de RNA, que posteriormente serán eliminadas por la DNA polimerasa I.

El desenrollamiento de la doble cadena de DNA requiere la participación de helicasas, topoisomerasas, y proteínas de unión a DNA de cadena sencilla

Durante la replicación, las dos hebras del DNA deben desenrollarse en cada horquilla de replicación con el fin de exponer las cadenas sencillas a las enzimas responsables de su duplicación. Existen tres clases de proteínas con funciones diferentes que facilitan el proceso de desenrollamiento: *DNA helicasas*, *topoisomerasas*, y *proteínas de unión al DNA de cadena sencilla* (Figura 19.12).

Las proteínas directamente responsables de desenrollar el DNA, son las **DNA helicasas.** Usando la energía de hidrólisis del ATP, las helicasas desenrollan el DNA por delante de la horquilla de replicación, rompiendo los puentes de hidrógeno a medida que avanzan. Al menos dos helicasas están implicadas en la replicación del DNA en *E. coli*: una se une a la cadena patrón retrasada y se mueve en dirección 5′ → 3′, y la otra se une a la cadena patrón conductora y se mueve en dirección 3′ → 5′. Las dos forman parte del primosoma, pero la helicasa 5′ → 3′ es más importante para el desenrollamiento del DNA en la horquilla de replicación.

El desenrollamiento asociado a la replicación del DNA podría provocar el superenrollamiento y embrollamiento en el resto del DNA, si no fuese por la acción de las topoisomerasas, que fueron tratadas en el Capítulo 18. Estas proteínas crean puntos de giro en la molécula de DNA realizando cortes en una o ambas cadenas de la doble hélice, para después repararlas rápidamente. De las aproximadamente 10 topoisomerasas descritas en *E. coli*, la que parece más importante en la replicación del DNA es la *DNA girasa*, una topoisomerasa de tipo II (una enzima que corta ambas cadenas del DNA). La DNA girasa introduce sobreenrollamientos negativos y relaja así los positivos, utilizando la energía derivada del ATP. La DNA girasa funciona como el principal pivote que previene el sobreenrollamiento (sobreenroscamiento positivo) del DNA por delante de la horquilla de replicación. Esta enzima tiene además una función en la iniciación y la finalización de la replicación del DNA en *E. coli*, abriendo la doble hélice en el origen de replicación y separando los dos DNAs circulares de las cadenas hijas, al final del proceso. Este fenómeno no se conoce tan bien en eucariotas, aunque se han aislado topoisomerasas de ambos tipos.

Una vez que ha comenzado la separación de las hebras, las **proteínas de unión al DNA de cadena sencilla (SSB)** se unen rápidamente a dichas cadenas sencillas, manteniendo así desenrollado al DNA y por lo tanto accesible, a la maquinaria de replicación. Después de que un fragmento de DNA se haya replicado, las moléculas de SSB se despegan y son recicladas, uniéndose al siguiente fragmento de cadena sencilla.

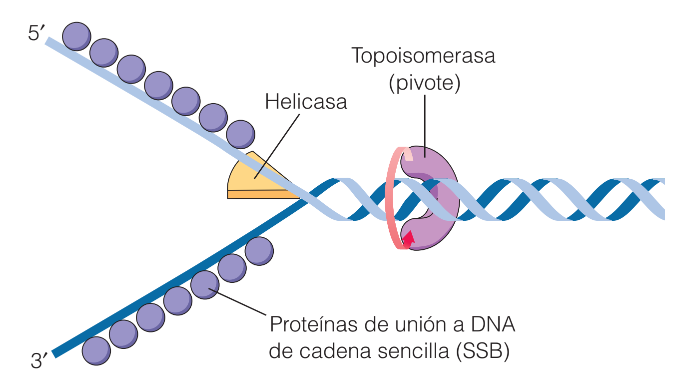


Figura 19.12 Proteínas implicadas en el desenrollamiento del DNA en la horquilla de replicación. Se requieren tres proteínas para este aspecto de la replicación del DNA: las proteínas desenrollantes propiamente dichas son las helicasas; la principal en *E. coli*, que forma parte del primosoma, funciona en dirección 5′ → 3′ a lo largo de la hebra patrón retrasada, como se muestra aquí. Las proteínas de unión a DNA de cadena sencilla (SSB) mantienen extendido el DNA desenrollado. Una topoisomerasa forma un pivote por delante de la horquilla de replicación; esta topoisomerasa es en *E. coli*, la DNA girasa.

Juntando las piezas: resumen de la replicación del DNA

La Figura 19.13 resume los puntos más importantes de lo que actualmente conocemos sobre la mecánica de replicación del DNA en *E. coli*. Todo comienza en el origen de replicación, donde la maquinaria en la horquilla de replicación incorpora secuencialmente las diferentes proteínas necesarias para la síntesis del DNA —esto es, la DNA helicasa, la girasa, la SSB, la primasa, la DNA polimerasa y la DNA ligasa—. También participan otras proteínas (no se muestran), que aumentan la eficacia global de la replicación del DNA. Como ejemplo se puede citar al *complejo de deslizamiento*, con forma de anillo, que rodea a la doble hélice de DNA y se une a la DNA polimerasa, permitiendo a ésta deslizarse a lo largo del DNA, a la vez que permanece fuertemente unida a él.

Las distintas proteínas que participan en la replicación se encuentran todas íntimamente asociadas en un gran complejo, denominado **replicosoma,** que tiene aproximadamente el tamaño de un ribosoma. La energía necesaria para la actividad y movimiento de replicosoma la suministra la hidrólisis de nucleósidos trifosfato. Entre éstos se incluyen los propios nucleósidos trifosfato (que son también usados como elementos de construcción por las DNA polimerasas y la primasa para la síntesis de DNA y RNA) y el ATP hidrolizado por otras proteínas de replicación del DNA (como la DNA helicasa, la girasa y la ligasa). A medida que el replicosoma se desplaza a lo largo del DNA en la direc-

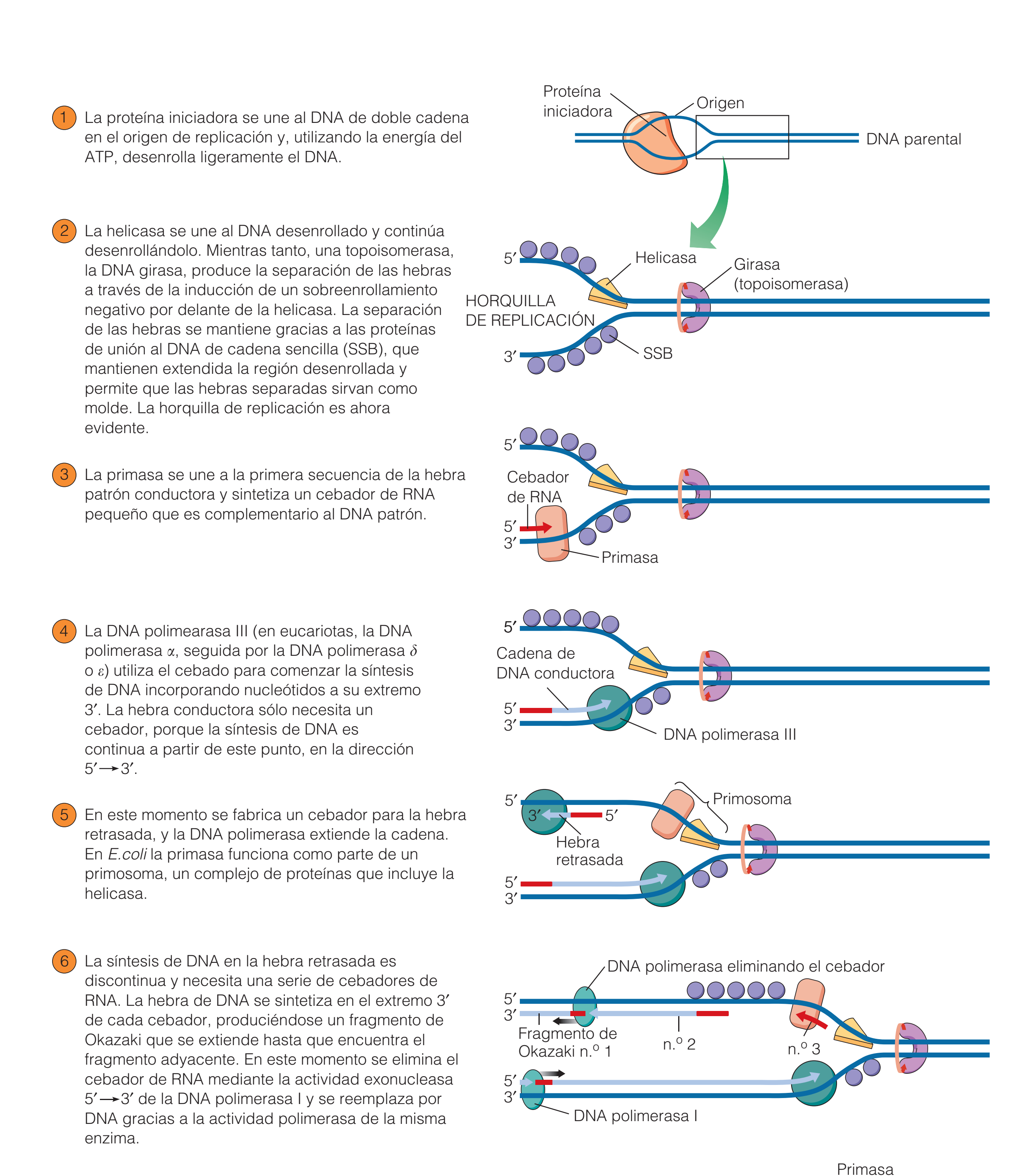


Figura 19.13 **Resumen de la replicación en las bacterias.** Esta figura representa la replicación del DNA en *E. coli* en siete etapas, con el inicio en el origen de replicación. Las dos horquillas de replicación se mueven en direcciones opuestas desde el origen, aunque sólo se representa una horquilla de los pasos ②-⑦. Las diferentes proteínas que se muestran aquí como entidades separadas, están realmente asociadas en un único gran complejo denominado replicosoma. La primasa y la helicasa se encuentran particularmente unidas y, junto con otras proteínas, forman un primosoma. El DNA parental se muestra en azul oscuro, el DNA recién sintetizado en azul claro, y el RNA en rojo. En este esquema no se representa la configuración topológica de las hebras de DNA.

ción de la horquilla de replicación, debe tener en cuenta el hecho de que el DNA se está sintetizando a lo largo del patrón en las dos hebras. La Figura 19.14 ilustra esquemáticamente cómo se lleva esto a cabo a través del plegamiento de la cadena patrón retrasada en un bucle. La formación de dicho bucle permite a las DNA polimerasas de las cadenas conductora y retrasada moverse ambas en la misma dirección, aunque las dos hebras patrón estén orientadas con polaridades contrarias.

En las células eucariotas, la enorme longitud y el elaborado plegamiento de los cromosomas suponen un reto especial para la replicación del DNA. Por ejemplo, ¿cómo se coordinan los numerosos orígenes de replicación y cómo está asociada su activación con otros sucesos clave del ciclo celular? Para responder a estas preguntas, necesitamos saber algo más de la organización espacial de la replicación del DNA en el núcleo. Cuando se incuban durante periodos de tiempo cortos con precursores de DNA que hacen que las hebras de nueva formación sean fluorescentes, el análisis al microscopio revela que el nuevo DNA fluorescente se encuentra en una serie de manchas concretas dispersas por todo el núcleo. Estas observaciones sugieren la existencia de estructuras aparentemente inmóviles, las llamadas «factorías de replicación», donde los replicosomas llevan a cabo la replicación de la cromatina. Estos sitios están íntimamente asociados a la superficie interna de la envuelta nuclear, aunque no está claro si se encuentran anclados a la membrana nuclear o a otro soporte nuclear. (Existen pruebas cada vez más numerosas de que las bacterias también introducen el DNA en replicosomas estacionarios para su replicación.)

Cuando una fibra de cromatina se introduce en una factoría de replicación, ¿cómo se quitan las histonas y otras proteínas cromosómicas para que el DNA se pueda replicar y cómo se reintroducen de nuevo después de que se hayan formado las dos cadenas de DNA nuevas? Los investigadores han desvelado que el desplegamiento de las fibras de cromatina por delante de la horquilla de replicación viene facilitado por las *proteínas remodeladoras de la cromatina*, que modifican el empaquetamiento del nucleosoma para que la maquinaria de replicación pueda acceder al DNA molde. A medida que se mueve la horquilla de replicación, los nucleosomas se deslizan desde la doble hélice de DNA parental, por delante de la horquilla de replicación, a las cadenas de nueva formación, por detrás de la horquilla de replicación. Al mismo tiempo, también se insertan nuevos nucleosomas en las cadenas recién formadas, ya que las dos moléculas de DNA generadas mediante la replicación, necesitarán el doble de los nucleosomas que contuviese el DNA parental antes de la replicación. ¿Pero cómo y cuándo se incorporan las otras proteínas cromosómicas? ¿Qué es lo que controla los niveles más altos de empaquetamiento de la cromatina, y cómo se lleva a cabo todo esto sin enmarañar la cromatina? Se están realizando investigaciones, con mayor o menor éxito, orientadas a solventar éstas y otras cuestiones. Mientras tanto, se dispone ya de una respuesta a una de las preguntas más desconcertantes en la replicación de eucariotas, el problema del final de la replicación.

Los telómeros solucionan el problema del final de la replicación

Si seguimos el proceso que se resume en la Figura 19.13 en el genoma circular de *E. coli*, o en cualquier otro DNA circular, acabaremos completando el círculo. La cadena conductora puede simplemente continuar creciendo en dirección 5′ ⟶ 3′ hasta que su extremo 3′ se una al extremo 5′ de la cadena retrasada que viene en la otra dirección. Y en la cadena retrasada, el último pequeño fragmento sintetizado —el que se intercambia por el cebador de RNA del último fragmento de Okazaki— se puede añadir al grupo —OH del extremo 3′ de la cadena conductora que viene en la otra dirección.

Sin embargo, el hecho de que las DNA polimerasas sólo puedan añadir nucleótidos al grupo –OH del extremo 3′ de una cadena de DNA preexistente, genera un serio problema en las moléculas de DNA lineales. Este problema se esquematiza en la Figura 19.15. Cuando una cadena retrasada (azul más claro) encuentra el final de la molécula de DNA y se elimina el último cebador de RNA por la exonucleasa 5′ ⟶ 3′, el hueco final no puede ser rellenado porque no existe extremo 3′ al que unir desoxinucleótidos. En consecuencia, las moléculas de DNA lineales corren peligro de producir moléculas de DNA hijas más pequeñas cada vez que se repliquen. Obviamente, si esto continuase indefinidamente, ¡hoy no estaríamos aquí!

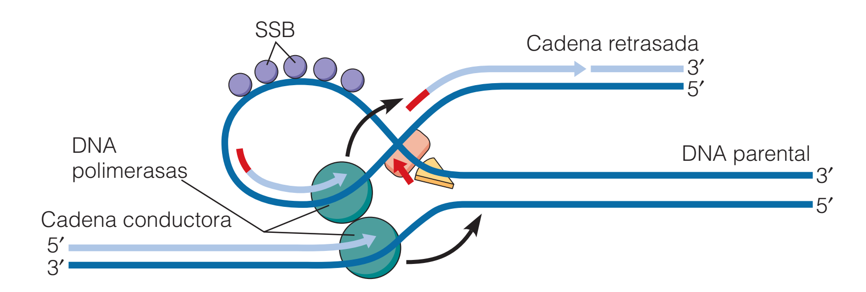


Figura 19.14 Localización de las proteínas en la horquilla de replicación. Este modelo muestra la manera en la que se cree que se organizan en la horquilla de replicación, las proteínas con un papel clave en la replicación, que se ilustraron en la Figura 19.13. El aspecto distinguible más importante es que la cadena de DNA retrasada está plegada formando un bucle, que permite que las DNA polimerasas de las cadenas conductora y retrasada funcionen juntas y se muevan en la misma dirección física (flechas negras), aunque las dos cadenas patrón tengan una polaridad distinta en la molécula del DNA parental.

1 La replicación del DNA se inicia en el origen; la burbuja de replicación crece a medida que las dos horquillas de replicación se mueven en direcciones opuestas.

2 Sólo un cebador (rojo) permanece al final en cada molécula de DNA hija.

3 Los últimos cebadores son eliminados por la exonucleasa 5′⟶3′, pero ninguna DNA polimerasa puede rellenar el hueco porque no hay ningún –OH en 3′ disponible, al que se pueda incorporar un nucleótido.

4 En cada ciclo de replicación se producen moléculas de DNA cada vez más pequeñas.

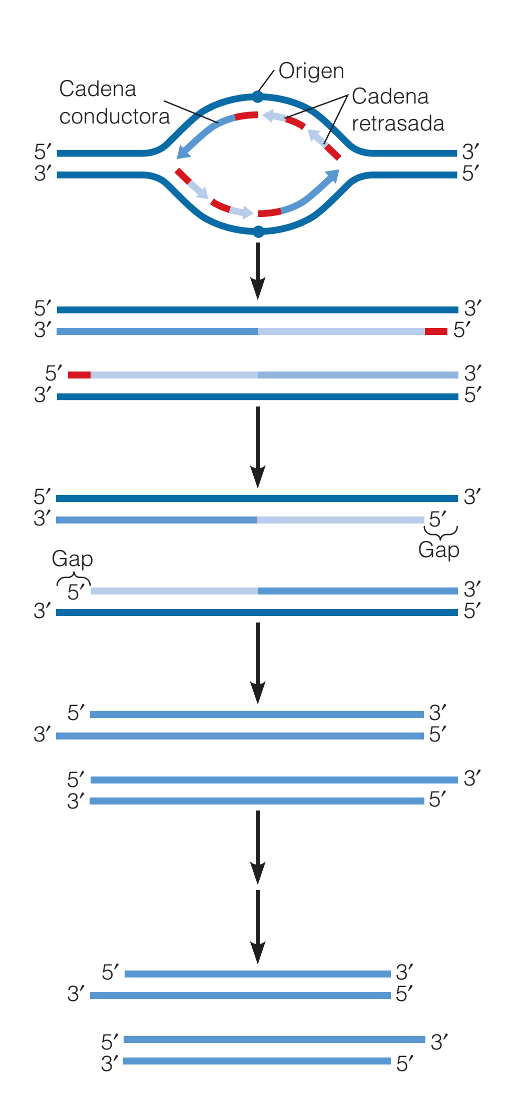


Figura 19.15 El problema de la finalización de la replicación. En la molécula de DNA lineal, como la de los cromosomas eucariotas, la maquinaria de replicación habitual no es capaz de replicar los extremos. Como resultado, en cada ciclo de replicación, la molécula de DNA se acorta, lo que tiene unas consecuencias potencialmente deletéreas para la célula. En este esquema, las cadenas de DNA parental se representan en azul oscuro, las hebras hijas en azul claro, y los cebadores de RNA en rojo. Para simplificar, sólo se representa un origen de replicación y, en los dos últimos pasos, sólo la molécula más corta de la progenie (la cadena hija retrasada se indica con el azul más claro en los tres primeros pasos para señalar un aspecto no relacionado con el problema de la finalización, es decir, que cada cadena hija es una cadena conductora en un extremo y retrasada en el otro. Esto se puede observar en la figura porque se muestra la molécula en replicación completa, con ambas horquillas de replicación).

Los virus que poseen DNA lineal solucionan este problema de diferentes maneras. En algunos casos, como en el bacteriófago λ, el DNA lineal forma un círculo cerrado antes de replicarse. En otros casos, los virus utilizan estrategias de replicación más exóticas, aunque la DNA polimerasa siempre progresa en dirección 5′ ⟶ 3′, añadiendo nucleótidos al extremo 3′.

Los ecuariotas han solucionado el problema del final de la replicación incorporando secuencias de DNA altamente repetitivas, o **telómeros**, en los extremos terminales de cada cromosoma lineal. Estos telómeros consisten en secuencias cortas repetitivas con un alto contenido en la base G en la cadena 5′ ⟶ 3′. La secuencia TTAGGG, situada al final de los cromosomas humanos, es un ejemplo de dicha secuencia telomérica o *secuencia TEL*. Los telómeros humanos contienen normalmente entre 100 y 1.500 copias de la secuencia TTAGGG repetida en tándem. Dichas secuencias no codificantes en los extremos de los cromosomas aseguran que la célula no pierda ninguna información importante en el caso de que la molécula sea acortada ligeramente durante el proceso de replicación del DNA. Es más, una DNA polimerasa, denominada **telomerasa**, puede catalizar la formación de copias adicionales de la secuencia telomérica, compensando de esta manera el acortamiento gradual que tiene lugar en ambos extremos del cromosoma durante la replicación del DNA.

La telomerasa es una enzima poco habitual en el sentido de que está compuesta por RNA además de por proteína. En el protozoo *Tetrahymena*, cuyas telomerasas fueron las primeras en ser aisladas, la parte de RNA de la molécula contenía la secuencia 3′-AACCCC-5′, que es complementaria a la secuencia repetida 5′-TTGGGG-3′ que conforma los telómeros de *Tetrahymena*. Como se muestra en la Figura 19.16, este RNA unido a una enzima, se usa como molde para crear la secuencia repetitiva de DNA que se incorpora en los extremos de los telómeros. Una vez que han sido alargados, los telómeros quedan protegidos por unas *proteínas casquete de los telómeros*, que se unen al extremo 3′ expuesto del DNA. Además, en muchos eucariotas, el extremo 3′ del DNA puede girarse y emparejarse con la cadena de DNA opuesta, produciendo un bucle cerrado que posiblemente proteja el extremo del telómero (*véase* paso ⑤ de la Figura 19.16).

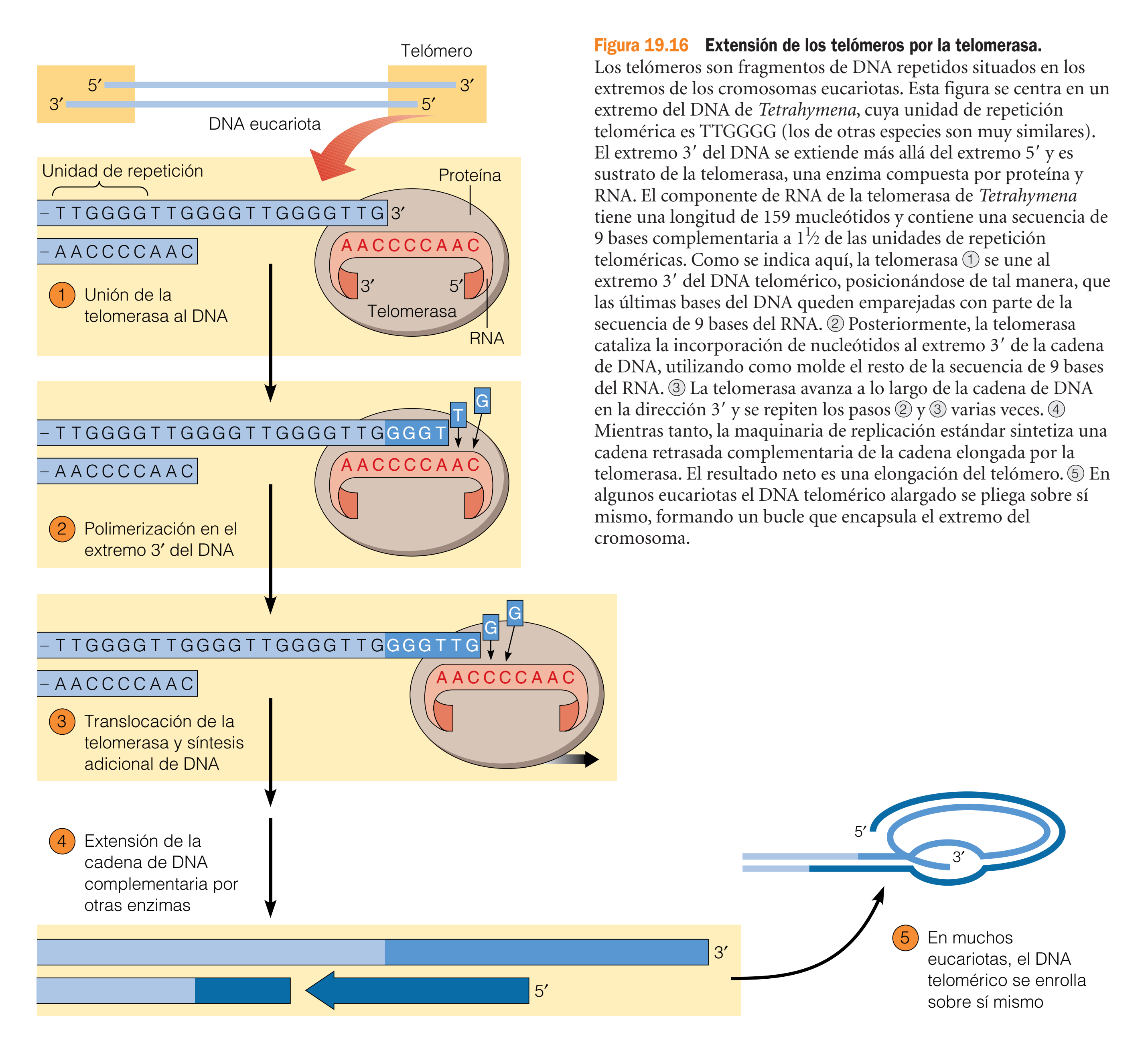


Figura 19.16 **Extensión de los telómeros por la telomerasa.** Los telómeros son fragmentos de DNA repetidos situados en los extremos de los cromosomas eucariotas. Esta figura se centra en un extremo del DNA de *Tetrahymena*, cuya unidad de repetición telomérica es TTGGGG (los de otras especies son muy similares). El extremo 3′ del DNA se extiende más allá del extremo 5′ y es sustrato de la telomerasa, una enzima compuesta por proteína y RNA. El componente de RNA de la telomerasa de *Tetrahymena* tiene una longitud de 159 mucleótidos y contiene una secuencia de 9 bases complementaria a 1½ de las unidades de repetición teloméricas. Como se indica aquí, la telomerasa ① se une al extremo 3′ del DNA telomérico, posicionándose de tal manera, que las últimas bases del DNA queden emparejadas con parte de la secuencia de 9 bases del RNA. ② Posteriormente, la telomerasa cataliza la incorporación de nucleótidos al extremo 3′ de la cadena de DNA, utilizando como molde el resto de la secuencia de 9 bases del RNA. ③ La telomerasa avanza a lo largo de la cadena de DNA en la dirección 3′ y se repiten los pasos ② y ③ varias veces. ④ Mientras tanto, la maquinaria de replicación estándar sintetiza una cadena retrasada complementaria de la cadena elongada por la telomerasa. El resultado neto es una elongación del telómero. ⑤ En algunos eucariotas el DNA telomérico alargado se pliega sobre sí mismo, formando un bucle que encapsula el extremo del cromosoma.

En los organismos pluricelulares, la telomerasa se encuentra en las *células germinales,* que dan lugar a los óvulos y a los espermatozoides, y en otros tipos de células con proliferación activa. La presencia de telomerasa permite a estas células dividirse indefinidamente sin que sus telómeros se acorten. Debido a que las telomerasas no se encuentran en la mayoría de las células, los telómeros de sus cromosomas se vuelven cada vez más cortos en cada división. En consecuencia, la longitud del telómero revela cuántas veces se ha dividido una célula. Si una célula se divide las veces suficientes, los telómeros corren peligro de desaparecer totalmente, y existe el riesgo de que su DNA codificante quede mermado. Este peligro potencial se evita mediante un mecanismo de muerte celular puesto en marcha por el DNA con los telómeros acortados. En resumen, cuando el DNA telómerico se vuelve demasiado corto para unir proteínas casquete teloméricas o para producir un bucle, sus extremos de DNA quedan expuestos, lo cual constituye una señal de activación de la *apoptosis*, un tipo de muerte celular programada que se trató en el Capítulo 14.

Es posible que los telómeros, que tienen en el momento del nacimiento unas 10.000 pares de bases en el hombre, sean lo suficientemente largos para soportar más de una vida de erosión replicativa sin desencadenar la muerte celular. Pero es posible también que los telómeros sean un factor limitante que determine la duración de la vida de un organismo. A este respecto, es importante señalar que la introducción de la telomerasa en células humanas en cultivo prolonga el tiempo de supervivencia de dichas células.

Además de en las células germinales y en otros tipos celulares especiales con una elevada proliferación, las telomerasas se encuentran también en las células cancerosas del ser humano. Las células cancerosas sufren un número inusualmente elevado de divisiones, por lo que sus telómeros se hacen extremadamente pequeños. Este acortamiento progresivo de los telómeros produciría la autodestrucción de la célula cancerosa, a no ser que la telomerasa estabilizase la longitud de los telómeros. Esto es exactamente lo que parece ocurrir. En un estudio de un gran número de muestras celulares humanas, incluyendo más de cien tipos diferentes de células tumorales, se ha comprobado que la actividad telomerasa está presente en la mayoría de los tumores, faltando en las células normales. Si la telomerasa resulta ser un factor importante en el desarrollo del cáncer, podría constituir una diana en el desarrollo de fármacos anticancerígenos.

El DNA eucariota tiene licencia para replicarse

Al margen de la necesidad de los telómeros de solucionar el problema de la terminación de la replicación, las células eucariotas también necesitan un mecanismo que asegure que las moléculas de DNA nuclear se repliquen una vez y sólo una vez, antes de la división celular. Para asegurar esta restricción, existe un proceso conocido como **autorización** que garantiza que después de que el DNA se replique en un determinado origen de replicación durante la fase S, el DNA en ese sitio no sea competente (o esté autorizado) para una ronda adicional de replicación hasta que la célula haya sufrido la mitosis.

La autorización se basa en la unión del ORC, el MCM y las proteínas cargadoras de helicasas a los orígenes de replicación (descritos en la página X). Esto hace que el DNA esté autorizado para iniciar la replicación. Después de que se haya iniciado la replicación a través de la unión de proteínas adicionales (incluidas la DNA polimerasa y la primasa), varios procesos impiden que se autorice el mismo origen para iniciar una segunda replicación. Un factor clave en dichos procesos es la quinasa *dependiente de ciclina* (*Cdk*), una enzima con múltiples funciones en la célula y que será descrita posteriormente en este capítulo. Al final de la fase G1, se produce un tipo de Cdk que tienen una doble función: activar la síntesis de DNA en los orígenes autorizados y asegurar que estos orígenes no vuelvan a ser autorizados. La Cdk bloquea la reautorización a través de la fosforilación, y consecuente inactivación de los tres tipos de proteínas que se necesitan para la autorización (ORC, MCM y los cargadores de helicasas). Los eucariotas pluricelulares cuentan con un segundo inhibidor de la reautorización denominado *geminina*, que es una proteína que se produce durante la fase S y que bloquea la unión de las proteínas MCM al DNA. Una vez que la célula finaliza la mitosis, la geminina se degrada y la actividad de la Cdk disminuye, por lo que las proteínas que autorizan al DNA para su replicación, pueden funcionar de nuevo en el siguiente ciclo celular.

Daño y reparación del DNA

La fiabilidad con la que la información se almacena en el DNA y se mantiene de una generación de células a la siguiente, no sólo requiere que el DNA se replique con exactitud, sino también que se repare el daño que se produzca en él, ya sea espontáneamente o por la exposición a agentes ambientales. Desde luego, las alteraciones en el DNA pueden ser en ocasiones beneficiosas, porque los cambios en la secuencia de bases, o **mutaciones**, proporcionan la variabilidad genética que constituye la materia prima de la evolución. No obstante, la tasa con la que los organismos acumulan mutaciones es bastante baja; se ha estimado que un gen medio retiene sólo una mutación cada 200.000 años. Sin embargo, la tasa de mutación del DNA es muy superior a este número, si bien la mayor parte de los daños son reparados poco después de que ocurran y por tanto, no afectan a las generaciones siguientes. Es más, la mayor parte de las mutaciones ocurren en células que no son los espermatozoides o los óvulos, y no se transmiten a la descendencia.

El daño en el DNA se puede producir espontáneamente o en respuesta a mutágenos

Durante el proceso normal de la replicación del DNA, pueden ocurrir varios tipos de mutaciones de una manera espontánea. Las más comunes son las reacciones de despurinación y desaminación, que son reacciones de hidrólisis espontáneas provocadas por las interacciones aleatorias entre las moléculas de DNA y las moléculas de agua que se encuentran alrededor de ellas. La *despurinación* supone la pérdida de una base de purina (ya sea adenina o guanina) por la hidrólisis espontánea del enlace glicosídico que la une a la desoxirribosa (Figura 19.17a). Dicho enlace glicosídico es intrínsecamente inestable y es, de hecho, tan susceptible de ser hidrolizado, que una célula humana puede perder miles de bases púricas cada día. La *desaminación* es la eliminación del grupo amino de la base (-NH_2). Este tipo de alteración, que puede ocurrir en la adenina, la citosina o la guanina, cambia las propiedades de apareamiento de la base. De estas tres bases, la citosina es la más susceptible de ser desaminada, dando lugar a uracilo (Figura 19.17b). Al igual que la despurinación, la desaminación es una reacción hidrolítica, causada habitualmente por la colisión aleatoria de una molécula de agua con el enlace que une el grupo amino de la base con el anillo de purina o de pirimidina. En una célula humana típica, la tasa de daño del DNA por esta causa es de 100 desaminaciones por día.

Si no se repara una cadena de DNA a la que le faltan purinas o tiene bases desaminadas, se puede propagar una secuencia de bases errónea, cuando se utilice la cadena como molde para el siguiente ciclo de replicación. Por ejemplo, cuando una citosina se convierte en uracilo mediante desaminación, el uracilo se comporta como una timina en

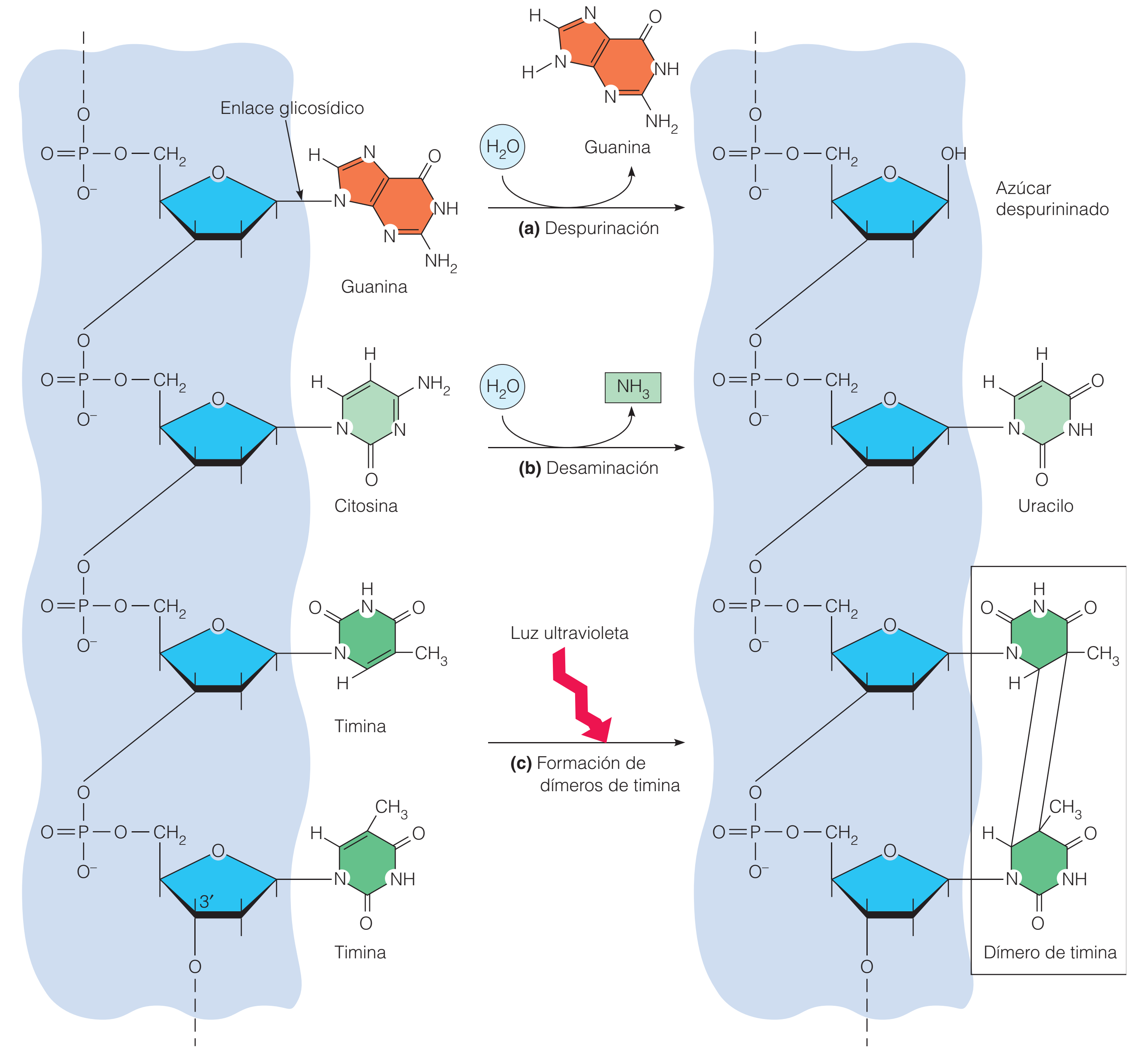


Figura 19.17 Algunos de los daños al DNA más comunes. Los cambios químicos más comunes que provocan daños en el DNA son (**a**) despurinación, (**b**) desaminación, y (**c**) formación de dímeros de pirimidina (que se indican aquí como dímeros de timina). La despurinación y la desaminación son reacciones espontáneas e hidrólisis, mientras que la formación de dímeros resulta de la acción de la luz ultravioleta, que induce la formación de uniones covalentes.

cuanto a sus propiedades de apareamiento, provocando la inserción de una adenina en la cadena contraria, en lugar de la guanina, que sería la base correcta. La consecuencia última de este cambio en la secuencia de bases puede ser un cambio en la secuencia de aminoácidos y en la función de la proteína que codifica el gen afectado.

Además de las mutaciones espontáneas, los agentes ambientales causantes de mutaciones, o *mutágenos*, pueden producir también daños en el DNA. Los agentes mutagénicos se pueden clasificar en dos categorías principales: agentes químicos y radiaciones. Los agentes mutagénicos químicos pueden producir el daño en el DNA por varios mecanismos: los *análogos de bases* tienen una estructura muy parecida a las bases nitrogenadas, y se incorporan al DNA; los *agentes que alteran las bases*, reaccionan químicamente con éstas y alteran su estructura; y por último, los agentes *intercalantes*, que se insertan entre las bases adyacentes de la doble cadena, provocando la alteración de la estructura del DNA y aumentando la probabilidad de que se elimine o se incorpore una base durante la replicación.

Las radiaciones de diversos tipos, pueden causar también daños en el DNA. La luz del sol es una fuente muy importante de radiación ultravioleta, que altera el DNA a través de la inducción de la *formación de dímeros de pirimidina*, es decir, la formación de enlaces covalentes entre bases de pirimidina adyacentes, habitualmente dos timinas (Figura 19.17c). Estos dímeros bloquean tanto la replicación como la transcripción, probablemente porque las enzimas que desempeñan dichas funciones se encuentran con el obstáculo de la protuberancia que se forma en la doble hélice del DNA. Las mutaciones también pueden ser causadas por los rayos X y las radiaciones emitidas por determinadas sustancias radiactivas. Este tipo de radicación se denomina radiación ionizante porque elimina electrones de las moléculas biológicas, produciendo intermediarios altamente reactivos que producen daños en el DNA.

La síntesis post-lesión y la reparación por escisión corrigen las mutaciones en nucleótidos anormales

No es sorprendente que se hayan desarrollado múltiples mecanismos para reparar el DNA dañado, dada la importancia de esta molécula para la viabilidad del organismo. En algunos casos, la reparación tiene lugar durante la replicación del DNA, utilizando DNA polimerasas especializadas que llevan a cabo una **síntesis post-lesión**, es decir, la síntesis de nuevo DNA en las regiones en las que el DNA patrón ha sido dañado. Aunque este tipo de síntesis de DNA es propensa al error, también es capaz de sintetizar cadenas de DNA nuevas, eliminado el daño. Por ejemplo, La DNA polimerasa η (eta) de eucariotas puede catalizar la síntesis de DNA de un fragmento que contenga un dímero de timina, insertando dos adeninas nuevas en la cadena nueva que se forme. Ya que la mutación se elimina en la hebra de síntesis nueva pero no en la hebra molde, se dice que la síntesis trans-lesión es un mecanismo tolerante al daño que puede impedir que se transmita una mutación a las cadenas de DNA sintetizadas de novo.

Los errores que aún persistan (o que aparezcan posteriormente) en el DNA, después de haber actuado la maquinaria de replicación, son competencia de un grupo de enzimas y proteínas diferente. En *E. coli* existen al menos 100 genes que codifican proteínas implicadas en la eliminación y en la sustitución de nucleótidos anormales. Estas proteínas forman parte de las reacciones de **reparación por escisión**, que corrigen los fallos en el DNA a través de un proceso simple que consiste en tres etapas (Figura 19.18). En la primera de ellas, se cortan los nucleótidos erróneos de una de las hebras de la doble cadena. Este proceso lo lleva a cabo un tipo especial de enzimas llamadas *endonucleasas* reparadoras, que son reclutadas al DNA por proteínas que reconocen los sitios en los que está dañado el DNA. Las endonucleasas reparadoras rompen la cadena de DNA por un sitio adyacente al del daño, mientras que otras enzimas se encargan de eliminar el nucleótido o nucleótidos erróneos.

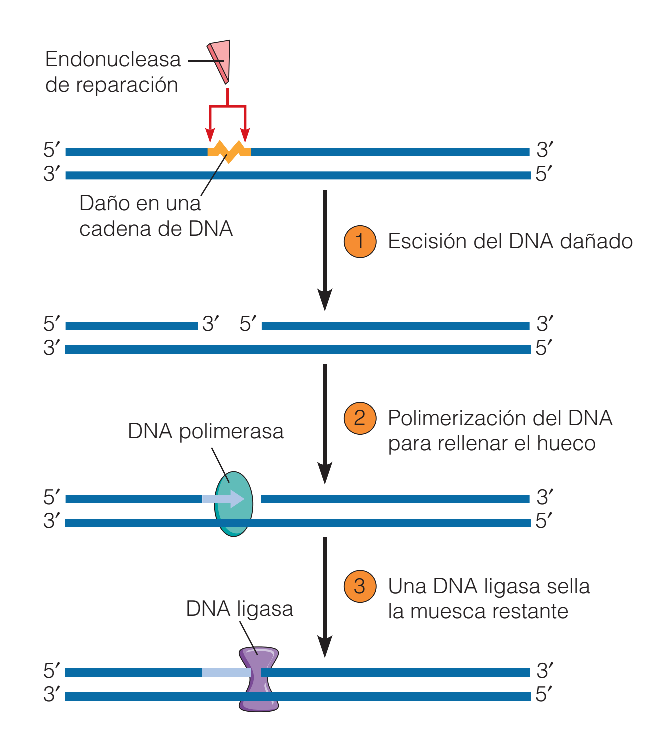


Figura 19.18 Esquema general de la reparación por escisión del DNA. Las tres etapas que se muestran aquí son comunes a todos los mecanismos de reparación por escisión del daño en una cadena del DNA. ① La parte dañada de una cadena de DNA, y probablemente parte del DNA a cada lado de él, es escindida de la doble hélice. en esta etapa es crucial una endonucleasa, que corta el DNA cerca del daño; posteriormente, una helicasa o una exonucleasa ayudan a la eliminación del segmento dañado. ② El hueco se rellena con una DNA polimerasa, que incorpora nucleótidos al extremo 3′ de la cadena; esta función la desempeña la DNA polimerasa I en *E. coli*. ③ Por último, una DNA ligasa sella el corte que queda.

Por ejemplo, una helicasa debe desenrollar el DNA situado entre dos puntos para liberar el DNA dañado de la doble hélice del DNA; por otra parte, una exonucleasa se debe unir al extremo creado por la escisión y digerir la cadena dañada nucleótido a nucleótido. La segunda etapa en el proceso consiste en la sustitución de los nucleótidos eliminados por los correctos, mediante una DNA polimerasa —que en *E. coli*, suele ser la DNA polimerasa I—. La secuencia de nucleótidos de la hebra complementaria se utiliza como molde para asegurar la inserción de las bases apropiadas, tal y como sucede durante la replicación del DNA. Finalmente, en el tercer paso, la DNA ligasa sella la muesca que queda en la hebra reparada a través de la formación de un enlace fosfodiéster.

Se pueden diferenciar dos grandes tipos de reacciones de reparación por escisión, las *reparaciones de bases por escisión* y *la reparación de nucleótidos por escisión*. En la primera de estas reacciones, la **reparación de bases por escisión**, se reparan bases individuales dañadas en el DNA. Por ejemplo, las bases desaminadas son detectadas por unas *glicosilasas del DNA* específicas, que reconocen una determinada base desaminada y la eliminan de la molécula de DNA, median-

te la ruptura del enlace entre la base y el azúcar al cual está unido. El azúcar, libre de la base, es reconocido por una endonucleasa reparadora que detecta la despurinación, que rompe el enlace fosfodiéster de un lado del azúcar al que le falta la base. Posteriormente, una segunda enzima completa la eliminación de la unidad azúcar-fosfato.

Para la eliminación de los dímeros de pirimidina y de otras lesiones voluminosas del DNA, las células utilizan el segundo tipo de reparación por escisión, la **reparación de nucleótidos por escisión (NER)**. Este sistema de reparación utiliza proteínas que reconocen las deformaciones graves en la doble hélice del DNA y reclutan una enzima denominada *endonucleasa NER* (*o escinucleasa*), que realiza dos cortes en la doble hélice del DNA, uno a cada lado de la deformación. Después una DNA helicasa se une al fragmento de DNA situado entre los cortes (con una longitud de 12 nucleótidos en *E. coli*, y de 29 en el hombre) y lo desenrolla, liberándolo. Finalmente, el hueco resultante lo rellena una DNA polimerasa y lo sella una DNA ligasa. El sistema NER es uno de los sistemas más versátiles de reparación del DNA de la célula, pues es capaz de reconocer y corregir muchos tipos de daños que, de otra manera, no serían reparados. La importancia del sistema NER se pone en evidencia por la gravedad del pronóstico en las personas que padecen mutaciones que afectan a dicho sistema. Por ejemplo, las personas que padecen la enfermedad xeroderma pigmentosa, presentan una mutación en uno de los siete genes que codifican los componentes del sistema NER. En consecuencia, son incapaces de reparar el daño en el DNA producido por la radiación ultravioleta de la luz del sol y por tanto, tienen un alto riesgo de padecer cáncer de piel.

La reparación de los apareamientos erróneos corrige las mutaciones consistentes en apareamientos de bases no complementarias

La reparación por escisión es un mecanismo potente para corregir los daños en los que existan nucleótidos anormales. Sin embargo, no es el único error en el DNA que pueden reparar las células. El mecanismo de reparación denominado **reparación de los apareamientos erróneos,** se encarga de los errores cometidos durante la replicación del DNA, que escapen a los mecanismos normales de corrección de errores y en los que exista un apareamiento incorrecto de bases. El sistema de reparación de los apareamientos erróneos detecta los errores porque los puentes de hidrógeno entre bases no complementarias no se establecen adecuadamente. Pero para funcionar correctamente, este sistema de reparación debe solucionar un problema que ha intrigado a los biólogos durante muchos años: ¿Cómo se distingue la base *incorrecta* de la *correcta* en un par de bases? A diferencia de lo que sucede en la reparación por escisión, ninguna de las bases en un apareamiento erróneo posee una alteración estructural que la señale como una base anormal. El par está compuesto simplemente por dos bases normales que no están apareadas correctamente, como si la adenina se empareja con la citosina o la guanina con la timina. Si la base errónea de un par AC fuese la C, y el sistema de reparación eliminase la A en su lugar, ¡el sistema de reparación crearía una mutación permanente en lugar de corregir un apareamiento de bases erróneo!

Para solucionar este problema, el sistema de reparación de apareamientos erróneos debe reconocer cuál de las dos hebras es la que se sintetizó de novo durante el ciclo de replicación anterior del DNA (la nueva hebra sería la que posee la base incorrectamente insertada). La bacteria *E. coli* emplea un sistema de detección basado en el hecho de que normalmente se añade un grupo metilo a la adenina (A) de la secuencia GATC en el DNA, donde quiera que ésta aparezca. El proceso de *metilación del DNA* tiene lugar cierto tiempo después de que se haya sintetizado la nueva hebra de DNA; por lo tanto, el sistema de reparación de los apareamientos erróneos puede diferenciar la nueva hebra a través de la detección del estado aún no metilado. Posteriormente, una endonucleasa hace un único corte en la hebra no metilada y una exonucleasa elimina los nucleótidos incorrectos de la cadena cortada.

Aunque la mayor parte de las investigaciones que apoyan la existencia del sistema de reparación de los apareamientos erróneos ha sido desarrollada en bacterias, también se han detectado sistemas de reparación análogos en eucariotas, si bien se diferencian de los propios de bacterias, en que utilizan mecanismos diferentes de la mutilación, para distinguir la cadena de DNA sintetizada de novo. La importancia del sistema de reparación de los apareamientos erróneos viene subrayada por el descubrimiento de que uno de los cánceres hereditarios más comunes, el *cáncer de colon hereditario de tipo no polipoide* (*HNPCC*), se produce por la mutación de los genes que codifican proteínas que participan en el sistema de reparación de los apareamientos erróneos.

La reparación de los daños ayuda a explicar por qué el DNA contiene timina en vez de uracilo

El porqué el DNA contiene timina en vez de uracilo, ha sido un interrogante sin solución durante muchos años. Ambas bases se aparean con la adenina, pero la timina contiene un grupo metilo ausente en el uracilo (Figura 19.19). Desde un punto de vista energético, tendría más sentido que el DNA contuviese uracilo, porque la etapa de metilación que ocurre durante la síntesis de timina es energéticamente costosa. Pero ahora que conocemos cómo se repara un daño por desaminación, entendemos por qué es la timina, y no el uracilo, la que está presente en el DNA.

Cuando el DNA sufre un daño por desaminación, la citosina se convierte en uracilo (Figura 19.17b), que es detectado y eliminado posteriormente por la enzima de reparación del DNA, *uracil-DNA glicosilasa*. Pero si el uracilo fuese un componente normal en el DNA, la reparación no

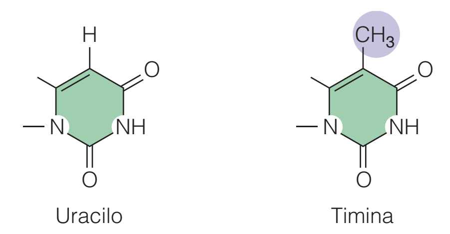


Figura 19.19. Uracilo y timina comparados.

tendría lugar porque no se podrían distinguir estos uracilos normales de los uracilos generados por la desaminación accidental de la citosina. Utilizando timina en vez de uracilo, la célula se asegura que el daño causado por la desaminación de la citosina en el DNA pueda ser reconocido y reparado, sin causar cambios adicionales.

La ruptura de las dos cadenas del DNA se repara por la unión de extremos no homólogos o por recombinación homóloga

Los mecanismos de reparación descritos hasta ahora —escisión y reparación de los apareamientos erróneos— son eficaces corrigiendo daños en el DNA, provocados por bases erróneas o alteradas químicamente. En dichos casos, una estrategia de «corta y pega» elimina los nucleótidos alterados o incorrectos de una de las cadenas del DNA, y el hueco resultante se rellena usando la cadena intacta como molde. Pero ciertos tipos de daños, como la ruptura de ambas cadenas en la doble hélice, no se pueden solventar de esta manera. La reparación de una ruptura en ambas cadenas es más complicada, ya que en otros tipos de daño, una de las dos hebras permanece intacta y se puede usar como molde para alinear y reparar la hebra dañada. Por el contrario, las rupturas de las dos cadenas, cortan la doble hélice en dos fragmentos individuales y la maquinaria de reparación se enfrenta ahora con el problema de identificar los dos fragmentos correctos y de volver a unir sus extremos rotos sin que se pierda ningún nucleótido.

En estos casos se emplean dos estrategias: una, denominada **unión de extremos no homólogos**, utiliza un grupo de proteínas que se unen a los extremos de los dos fragmentos de DNA rotos y los unen de nuevo. Desafortunadamente, este mecanismo tiene mucho error porque no es capaz de impedir la pérdida de los nucleótidos de los extremos rotos y no tiene manera de asegurar que se estén uniendo los fragmentos de DNA correctos. Un método más preciso para arreglar la rotura de ambas cadenas, denominado **recombinación homóloga**, se aprovecha del hecho de que la célula posee normalmente dos copias de cada cromosoma; si la molécula de DNA de un cromosoma sufre una rotura de las dos cadenas, se utiliza la copia intacta del DNA cromosómico como molde para guiar la reparación del cromosoma roto. Aparte de en la reparación de la ruptura de ambas cadenas, la recombinación homóloga también participa en el intercambio de información genética entre los cromosomas durante la meiosis para generar espermatozoides y óvulos. Retrasaremos por tanto la discusión de los mecanismos moleculares de la recombinación homóloga hasta el Capítulo 20, donde se describirán con detalle, tanto la meiosis, como la recombinación homóloga.

Ahora que hemos visto los diferentes tipos de reparación del DNA, es importante resaltar que en algunos casos, las mismas proteínas participan en más de un mecanismo de reparación. Es más, muchas de «estas proteínas de reparación», tienen funciones adicionales en otros procesos importantes, como la replicación del DNA, la transcripción génica, la recombinación genética, y el control del ciclo celular. En otras palabras, parece que se usa el mismo juego de herramientas moleculares para diferentes procesos relacionados con el DNA.

División nuclear y celular

Una vez examinados los mecanismos implicados en la replicación y reparación del DNA, podemos volver a plantearnos la cuestión de cómo se separan y se reparten en dos células hijas, las dos copias de cada DNA cromosómico, que se forman durante la fase S del ciclo celular. Estos procesos tienen lugar durante la fase M, que engloba la división nuclear (mitosis) y la división citoplasmática (citocinesis).

La mitosis se subdivide en Profase, Prometafase, Metafase, Anafase y Telofase

La mitosis se ha estudiado durante más de cien años, pero sólo en las últimas décadas se ha hecho un progreso significativo en la comprensión del proceso mitótico en el nivel molecular. Comenzaremos con el análisis de los cambios morfológicos que tienen lugar en una célula mientras sufre la mitosis, y examinaremos posteriormente los mecanismos moleculares subyacentes.

Desde un punto de vista morfológico, la mitosis puede subdividirse en cinco etapas secuenciales, que están basadas, principalmente, en el aspecto y en el comportamiento de los cromosomas. Estas cinco fases son la *profase*, *prometafase*, *metafase*, *anafase* y *telofase*. (Un término alternativo para la prometafase es profase tardía.) Las fases en una célula animal típica se ilustran en la Figura 19.20; la Figura 19.21 recoge las etapas comparables en una célula vegetal. Según vayamos tratando los procesos que ocurren en cada fase, es necesario recordar, que el objetivo de la mitosis es asegurar que cada núcleo hijo reciba una copia de cada cromosoma, que previamente se ha duplicado.

Profase. Una vez finalizada la replicación del DNA, la célula sale de la fase S y entra en la fase G2 (Figura 19.1b), en la que se realizan las últimas preparaciones para el inicio de

INTERFASE

PROFASE

PROMETAFASE

Dos centrosomas, con dos centriolos cada uno

Membrana plasmática

Envuelta nuclear

Cromatina

Nucleolo

Microtúbulos (MTs) formando el huso mitótico

Cromosomas formados por dos cromátidas hermanas

Áster

Centrómero

Nucleolo desapareciendo

(a)

MT del áster

Fragmentos de la envuelta nuclear

Huso polar

Cinetocoro

(b)

Figura 19.20 Las fases de la mitosis en una célula animal. Las micrografías muestran la mitosis en células de un embrión de pez, vistas con el microscopio óptico. El huso mitótico, incluyendo los ásteres, es visible en las micrografías de la metafase y de la anafase. A un bajo aumento (cerca de 600X), observamos más «fibras» del huso que microtúbulos individuales; cada fibra está formada por un número determinado de microtúbulos. Los dibujos son esquemáticos e incluyen detalles que no se observan en la micrografía; para simplificar, sólo se han dibujado cuatro cromosomas (MT=microtúbulo).

Figura 19.21 Las fases de la mitosis en una célula vegetal. Estas micrografías muestran las etapas de la mitosis en células de raíz de cebolla, vistas con el microscopio óptico.



(a) Profase



(b) Prometafase

25 μm

METAFASE

ANAFASE

TELOFASE

Placa metafásica

Huso mitótico

MT del cinetocoro

MT polares

(c)

Cromosomas hijos

(d)

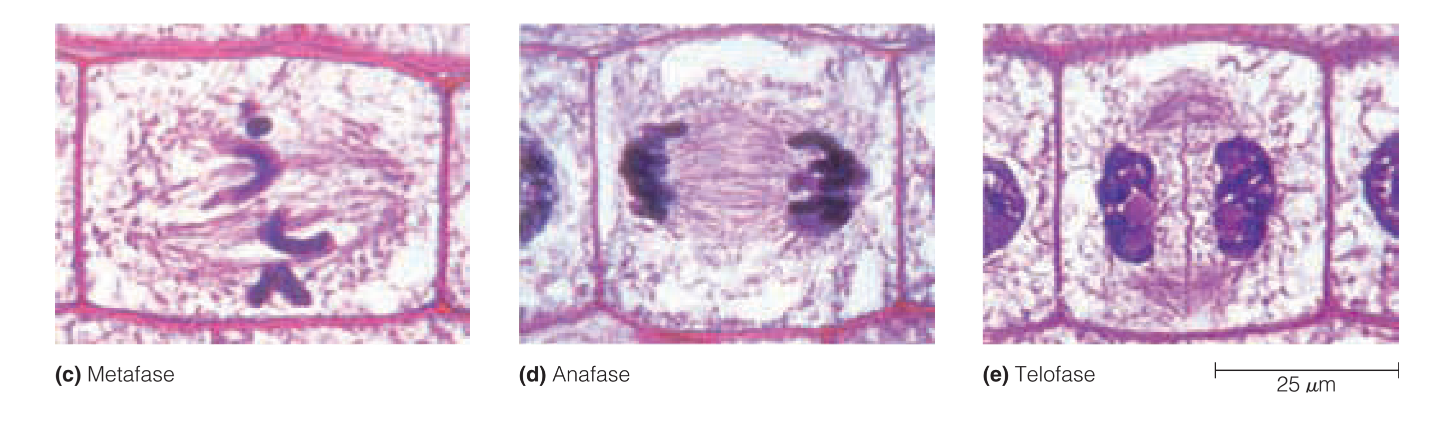
Envuelta nuclear formándose

Nucleolo formándose

Surco de segmentación

Cromosomas descondensándose

(e)



(c) Metafase

(d) Anafase

(e) Telofase

25 μm

la mitosis. Hacia el final de la fase G2, los cromosomas comienzan a condensarse, pasando de la cromatina relajada, extremadamente difusa, a las estructuras extensamente plegadas y compactas que son típicas de la mitosis. La condensación de los cromosomas es un fenómeno muy importante, porque las fibras de la cromatina son tan largas y están tan entremezcladas en la interfase, que si se mantuvieran en dicha forma descompactada, se enredarían inevitablemente durante la distribución del DNA cromosómico en la división celular. Aunque la transición entre la fase G2 y la profase no está muy definida, se considera que una célula se encuentra en **profase** cuando los cromosomas individuales se han condensado hasta el punto de ser visibles como objetos independientes en un microscopio óptico. Dado que el DNA cromosómico se ha replicado durante la fase S, cada cromosoma en la profase está compuesto por dos cromátidas hermanas, fuertemente unidas una a otra. En las células animales, el nucleolo se dispersa a medida que se condensan los cromosomas; en las células vegetales, el nucleolo puede permanecer como una entidad independiente, sufrir una descomposición parcial, o desaparecer por completo.

Mientras tanto, ha entrado en acción otro orgánulo importante. Éste es el **centrosoma**, una zona pequeña de material denso que se localiza junto al núcleo. El centrosoma es el centro organizador de microtúbulos más importante para el ensamblaje de éstos. Se duplica antes de la mitosis (habitualmente durante la fase S) y al comienzo de la profase los dos centrosomas se separan y comienzan a dirigirse hacia extremos opuestos. A medida que se mueven, cada centrosoma actúa como un centro de nucleación para el ensamblaje de los microtúbulos, y la región que se encuentra entre dos centrosomas comienza a rellenarse con microtúbulos en crecimiento que formarán el huso mitótico, la estructura que distribuirá más tarde los cromosomas en las dos células hijas. Durante este proceso, los microtúbulos del citoesqueleto se despolimerizan, y sus subunidades de tubulina se incorporan al huso mitótico en crecimiento. Al mismo tiempo, se forma en las inmediaciones de cada centrosoma un conjunto denso de microtúbulos radiales denominado *áster*.

En el centrosoma de las células animales, se encuentran inmersas un par de estructuras pequeñas y cilíndricas, compuestas por microtúbulos, que se llaman **centriolos,** y que normalmente se orientan formando un ángulo recto una respecto a la otra. Los centriolos no son esenciales para el desarrollo de la mitosis, ya que no se encuentran en algunos tipos celulares, como en los vegetales superiores. No obstante, participan en la formación de cilios y flagelos (*véase* Capítulo 16).

Aunque los centrosomas están implicados en la nucleación del huso mitótico en la mayoría de las células animales, las células de los vegetales superiores, así como células meióticas de muchos animales, forman husos sin la intervención de los centrosomas. Es más, en determinados experimentos en los que se han destruido los centrosomas sometiéndolos a microrradiación láser, se ha comprobado, que las células que normalmente poseen centrosomas, pueden formar husos mediante un mecanismo independiente del centrosoma. En dichos casos, se piensa que son los propios cromosomas mitóticos los promueven el ensamblaje y la estabilización de los microtúbulos. Si los husos se pueden formar sin la participación de los centrosomas, ¿están éstos implicados en alguna otra función relevante durante la división celular? Algunos estudios sugieren que los centrosomas facilitan la orientación del huso dentro de la célula, que a su vez determina la posición del plano de segmentación que finalmente la dividirá.

Prometafase. El comienzo de la prometafase lo marca la fragmentación de las membranas de la envuelta nuclear. A medida que los centrosomas completan su viaje hacia sitios opuestos del núcleo (Figura 19.20b), la ruptura de la envuelta nuclear permite a los microtúbulos entrar en la zona del núcleo y contactar con los cromosomas, que todavía están formados por dos cromátidas hermanas en esta etapa. Los micrótubulos del huso se unen a las dos cromátidas por el **centrómero**, un estrechamiento en cada cromátida, formado por una secuencia repetida de DNA, denominada *secuencia CEN*. En lugar de unirse directamente a las secuencias CEN, los microtúbulos del huso se unen a una estructura proteica asociada al centrómero llamada **cinetocoro**. Las proteínas del cinetocoro comienzan a asociarse al DNA poco después de que se replique durante la fase S, y se van añadiendo secuencialmente, hasta formar el cinetocoro maduro. Como se muestra en la Figura 19.22a , cada cromosoma dispone al final de dos cinetocoros situados en posiciones opuestas, cada uno de ellos asociado con una de las cromátidas. Durante la prometafase, los microtúbulos del huso se unen a estos cinetocoros, uniendo los cromosomas al huso. Los microtúbulos ejercen posteriormente una fuerza responsable de que los cromosomas se desplacen gradualmente hacia el centro de la célula (Figura 19.22b).

Aunque la composición de los microtúbulos del huso es prácticamente idéntica, se pueden clasificar en tres tipos principales atendiendo a las estructuras con las que interaccionan sus extremos. Aquellos que están unidos a los cinetocoros del cromosoma se denominan **microtúbulos del cinetocoro**; los que interaccionan con los microtúbulos del polo opuesto de la célula, se llaman **microtúbulos polares**; y los más pequeños, que forman el áster en cada polo se conocen como **microtúbulos del áster**. Algunos de los microtúbulos del áster parecen interaccionar con proteínas de la membrana plasmática.

Metafase. Se dice que la célula se encuentra en metafase, cuando los cromosomas, que se encuentran ahora en su máximo grado de condensación, se alinean en la *placa metafásica*, que es el plano equidistante entre los dos polos del

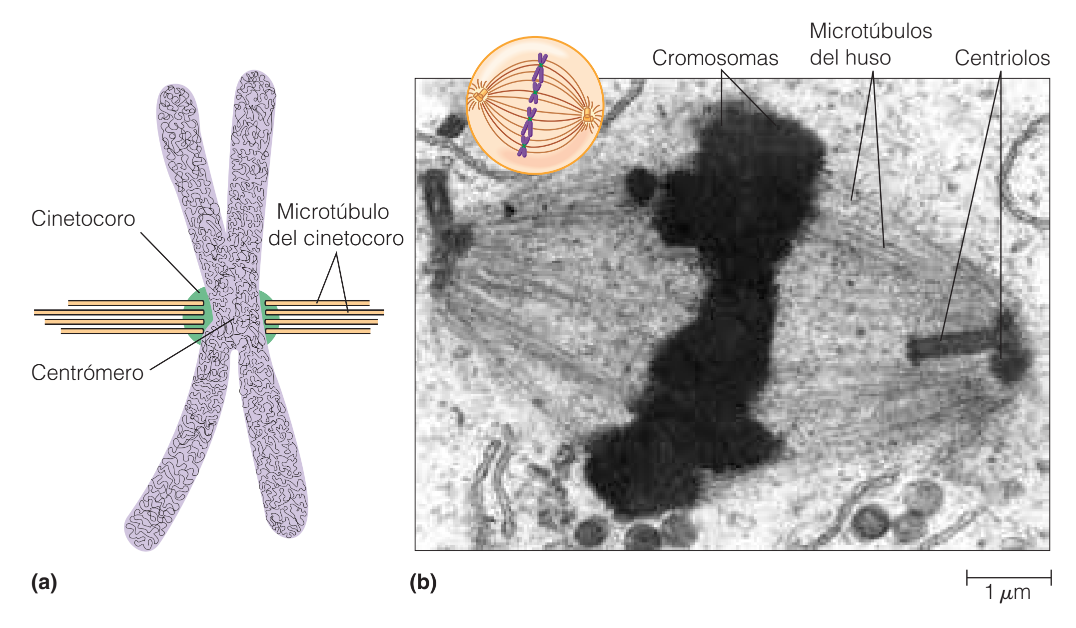
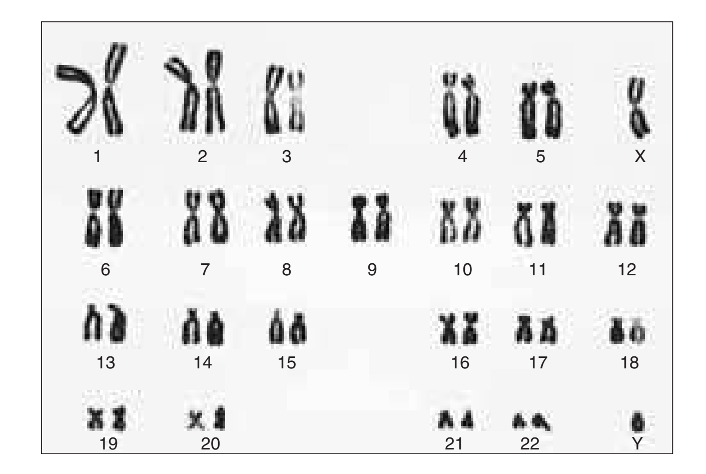


Figura 19.22 **Unión de los cromosomas al huso mitótico.** (**a**) Modelo esquemático que resume la relación entre el centrómero, los cinetocoros y los microtúbulos del cinetocoro. (**b**) Micrografía electrónica del huso mitótico de una célula de gallo en metafase. Se ven claramente los centriolos y las fibras del huso. Los cromosomas aparecen como una masa única alineada en el ecuador del huso mitótico. Aunque no se pueden distinguir los cromosomas individuales en este tipo de micrografía, en esta etapa de la mitosis ya están separados los unos de los otros (TEM).

huso mitótico (Figura 19.20c). La célula hace una pausa en la metafase, que dura cerca de 20 minutos de los 60 que dura aproximadamente la mitosis. Los fármacos que interfieren con la función del huso, como la *colchicina*, pueden usarse para bloquear a las células en metafase. El examen detallado de estas células permite la identificación y clasificación de los cromosomas individuales atendiendo a sus diferentes formas y tamaños. Este análisis se conoce como **cariotipo** (Figura 19.23).

Los cromosomas parecen estar relativamente quietos durante la metafase, pero esta apariencia es engañosa. De hecho, las dos cromátidas hermanas de cada cromosoma están siendo ya arrastradas hacia polos opuestos. Parece que estuvieran quietos porque las fuerzas que actúan sobre ellos son de la misma magnitud y sentido opuesto; las cromátidas son los premios de un tira y afloja entre dos oponentes con la misma fuerza. (Comentaremos dentro de poco el origen de estas fuerzas opuestas.)



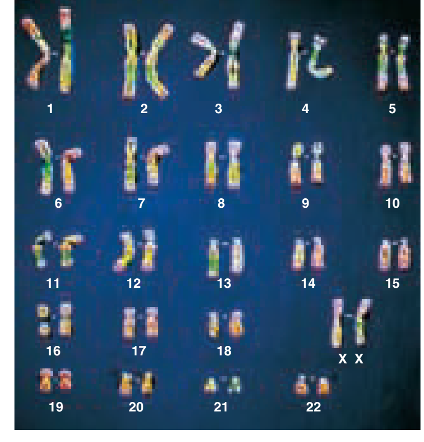


Figura 19.23 **Cariotipo de cromosomas mitóticos humanos, de células detenidas en la metafase.** (Izquierda) Este grupo de cromosomas obtenido a partir de las células de un varón, se han teñido con un colorante que reacciona de manera uniforme con todo el cuerpo del cromosoma. Los hombres tienen 22 pares de cromosomas, más un cromosoma X y otro cromosoma Y. Los cromosomas se han ordenado en el cariotipo atendiendo a su tamaño y a la posición de su centrómero. (Derecha) este grupo de cromosomas de una mujer se ha teñido con colorantes que reaccionan selectivamente con determinadas regiones del cromosoma, que produce un patrón de bandas único de cada cromosoma.

Anafase. Habitualmente, es la fase más corta de la mitosis y dura unos pocos minutos. Al principio de la anafase, las dos cromátidas hijas de cada cromosoma se separan abruptamente y comienzan a moverse hacia los polos opuestos del huso, a una velocidad aproximada de 1μm/min (Figura 19.20d).

La anafase se caracteriza por dos tipos de movimientos, denominados anafase A y anafase B (Figura 19.24). En la **anafase A**, los cromosomas, con el centrómero por delante, son empujados hacia los polos del huso a medida que los microtúbulos del cinetocoro se hacen progresivamente más pequeños. En la anafase B, los mismos polos se separan uno del otro a medida que los microtúbulos polares se alargan. Dependiendo del tipo celular, la anafase A y B pueden tener lugar simultáneamente, o la anafase B después de la anafase A.

Telofase. Al comienzo de la telofase, las cromátidas hijas han llegado ya a los polos del huso (Figura 19.20e). En este punto, se desenrollan y vuelven a adoptar la apariencia homogénea de las fibras extendidas de la cromatina de la interfase. Al mismo tiempo, el nucleolo se desarrolla en los organizadores nucleolares del DNA, el huso se desensambla, y reaparece la envuelta nuclear, alrededor de los dos grupos de cromosomas hijos, completándose así el proceso mitótico. Durante este periodo, la célula suele experimentar la citocinesis, que divide la célula en dos células hijas.

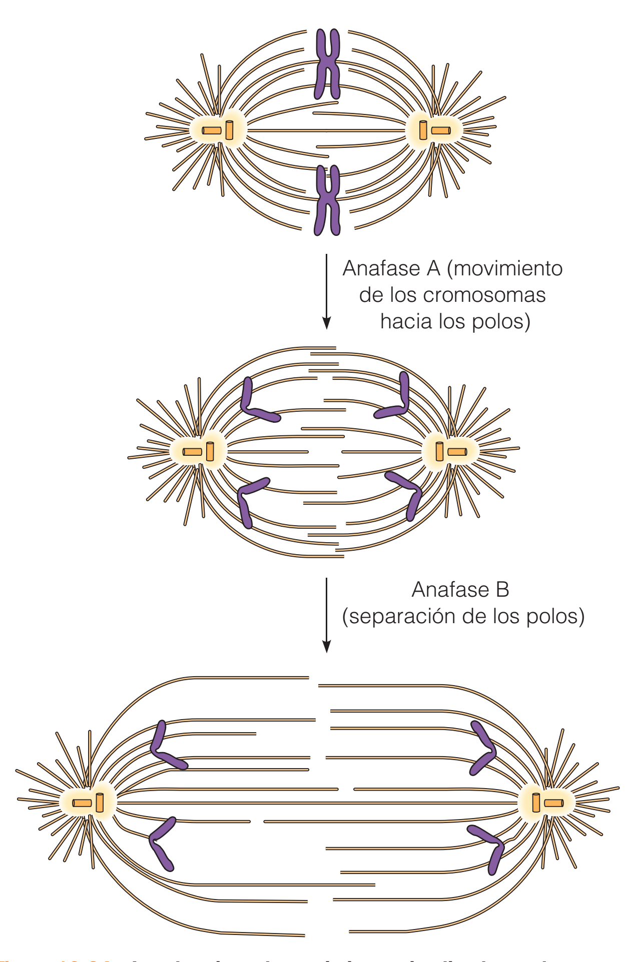


Figura 19.24 Los dos tipos de movimientos implicados en la separación de los cromosomas en la anafase. La anafase A supone el movimiento de los cromosomas hacia el polo del huso al que están unidos. La anafase B se basa en el alejamiento de los dos polos del huso. La anafase A y la anafase B pueden suceder simultáneamente.

El huso mitótico es el responsable del movimiento de los cromosomas durante la mitosis

El objetivo central de la mitosis es separar y repartir los dos grupos de cromosomas hijos, en dos células hijas nuevas. Para entender los mecanismos que permiten que se consiga esto, necesitamos analizar más de cerca el aparato formado por microtúbulos responsable de estos procesos, el huso mitótico.

Formación del huso y unión de los cromosomas. Como se describió en el Capítulo 15, el hecho de que todas las tubulinas estén orientadas en la misma dirección, confiere al microtúbulo una *polaridad* inherente; es decir, que los dos extremos de un microtúbulo son químicamente diferentes (Figura 19.25). El extremo donde comienza la polimerización del microtúbulo —situado en el centrosoma en el caso de los microtúbulos del huso— es el extremo *menos* (−), mientras que el extremo donde tiene lugar el crecimiento, situado lejos del centrosoma, es el extremo *más* (+). Los microtúbulos son estructuras dinámicas, en las que se incorporan y se desprenden continuamente subunidades de tubulina en ambos extremos. Cuando se incorporan más subunidades de las que se eliminan, el microtúbulo crece. En general, el extremo *más* es el sitio donde se da la incorporación de subunidades de tubulina, y el extremo *menos* donde se eliminan, por lo que el aumento en la longitud del microtúbulo se produce principalmente por la incorporación de subunidades en el extremo *más*.

Durante la profase tardía, la actividad de formación de microtúbulos se acelera dramáticamente y se incrementa la iniciación de nuevos microtúbulos en los centrosomas. Una vez que la envuelta nuclear se desintegra en el comienzo de la prometafase, se posibilita el contacto entre los cinetocoros de los cromosomas y los microtúbulos. Cuando se establece contacto entre un cinetocoro y el extremo más de un microtúbulo, se unen uno al otro, y el microtúbulo se denomina ahora como *microtúbulo del cinetocoro*. Esta unión ralentiza la velocidad de despolimerización en el extremo más del microtúbulo, aunque sigue siendo posible todavía la polimerización y la despolimerización en este lugar.

La Figura 19.26 es una micrografía electrónica de un cromosoma en metafase con dos grupos de microtúbulos del cinetocoro unidos. Los extremos *más* de los microtúbulos están embebidos en los dos cinetocoros. Cada cinetocoro es una estructura en forma de disco de tres capas,

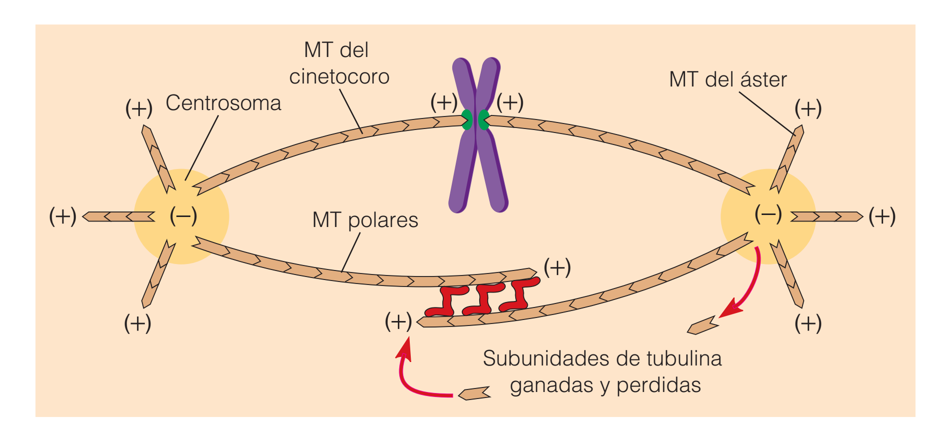


Figura 19.25 Polaridad de los microtúbulos en el huso mitótico. Este esquema sólo muestra algunos microtúbulos representativos de los muchos que conforman el huso. La orientación de las subunidades de tubulina que constituyen un microtúbulo (MT) hace que los dos extremos de un MT sean diferentes químicamente. El extremo *menos* se encuentra en el centrosoma; el extremo *más* apunta lejos del centrosoma. Los MTs crecen mediante la incorporación de subunidades de tubulina y se retraen perdiendo dichas subunidades. En general, el crecimiento se produce por la incorporación en los extremos *más* y el acortamiento por la pérdida en los extremos *menos*, aunque también se pueden eliminar subunidades desde el extremo *más*. Las estructuras en rojo entre los extremos más de los MTs polares representan a proteínas que los entrecruzan.

compuesto por proteínas unidas a las secuencias CEN situadas en el centrómero del DNA. El cinetocoro tiene un tamaño variable, en función de la especie. En las levaduras, por ejemplo, son pequeños y se unen sólo a un microtúbulo del huso cada uno, mientras que los cinetocoros de las células de mamíferos son mucho más grandes, uniendo cada uno 30-40 microtúbulos.

Dado que los dos cinetocoros están situados en lados opuestos del cromosoma, se unen normalmente a los microtúbulos provenientes de los polos opuestos de la célula (la orientación de cada cromosoma es aleatoria; cualquier

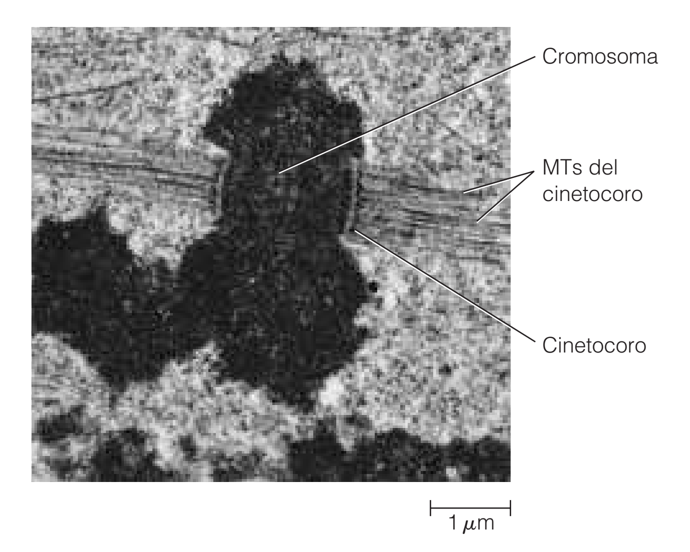


Figura 19.26 Cinetocoros y sus microtúbulos. Las estructuras rayadas a cada lado de este cromosoma metafásico son sus cinetocoros, cada uno de ellos asociado con una de las dos cromátidas hermanas. A cada cinetocoro se encuentran unidos muchos MTs. Los dos grupos de microtúbulos vienen de los polos opuestos de la célula (TEM).

cinetocoro puede finalizar en cualquier polo). Mientras tanto, el otro grupo de microtúbulos —los microtúbulos polares— se encuentran estableciendo contacto directo con los microtúbulos polares que provienen del centrosoma opuesto. Cuando las regiones de los extremos *más* de dos microtúbulos de polaridad opuesta comienzan a solapar, se unen a través de proteínas entrecruzadoras (Figura 19.25). Al igual que ocurre entre los cinetocoros y los microtúbulos del cinetocoro, dicho entrecruzamiento estabiliza los microtúbulos polares. Podemos imaginar a una batería de microtúbulos disparándose rápidamente desde cada centrosoma, durante la profase tardía y la prometafase. Aquellos que hagan diana en un cinetocoro o en un microtúbulo de polaridad contraria serán estabilizados; los otros se retraerán por despolimerización. En un principio se creía que el proceso por el que los microtúbulos encuentran un cinetocoro era completamente aleatorio, pero en estudios recientes se ha comprobado la existencia de señales moleculares que guían a los microtúbulos hacia los cromosomas.

Alineamiento y separación de los cromosomas. Durante la prometafase temprana, cuando los microtúbulos del huso contactan por primera vez con los cinetocoros de los cromosomas, éstos se encuentran distribuidos al azar en el huso. Después los cromosomas migran hacia la región central del huso a través de una serie movimientos oscilatorios que están generados por, al menos, dos tipos de fuerzas diferentes. En primer lugar, los microtúbulos del cinetocoro ejercen una fuerza «de atracción» que hace que los cromosomas se muevan hacia el polo al que están unidos. Se puede demostrar experimentalmente esta fuerza, separando a los cromosomas del huso, con la ayuda de una microaguja de vidrio. El cromosoma que ha sido desprendido del huso permanece inmóvil hasta que se unen a su cinetocoro nue-

vos microtúbulos, momento en el que vuelve a situarse en el huso.

La segunda fuerza tiende a «repeler» a los cromosomas si éstos se acercan a un polo del huso. Se ha demostrado la existencia de esta fuerza mediante la realización de experimentos en los que se desprende un extremo del cromosoma con un microrayo láser. Una vez que este fragmento se libera de su cinetocoro y del centromero, el fragmento tiende a alejarse del polo del huso más cercano, aun en el caso de que ya no esté unido al huso a través de los microtúbulos. Todavía no se ha identificado la naturaleza de esta fuerza repulsora que empuja a los cromosomas en ausencia de uniones a los microtúbulos.

La combinación de las fuerzas de atracción y de repulsión sobre los cromosomas, los conduce a la placa metafásica, su localización más estable y por tanto, el lugar en el que se alinean aleatoriamente. Aunque parezca que los cromosomas se dejan de mover en este punto, un examen más detallado de células vivas al microscopio revela que continúan sufriendo pequeños movimientos oscilatorios, lo que indica que los cromosomas están sometidos a una tensión en ambas direcciones. Si se destruye el cinetocoro situado en un lado de un cromosoma metafásico con un microrayo láser, el cromosoma emigrará sin dilación hacia el polo opuesto del huso. Así, los cromosomas metafásicos se mantienen en el centro del huso porque las fuerzas que los atraen hacia los polos opuestos están finamente equilibradas.

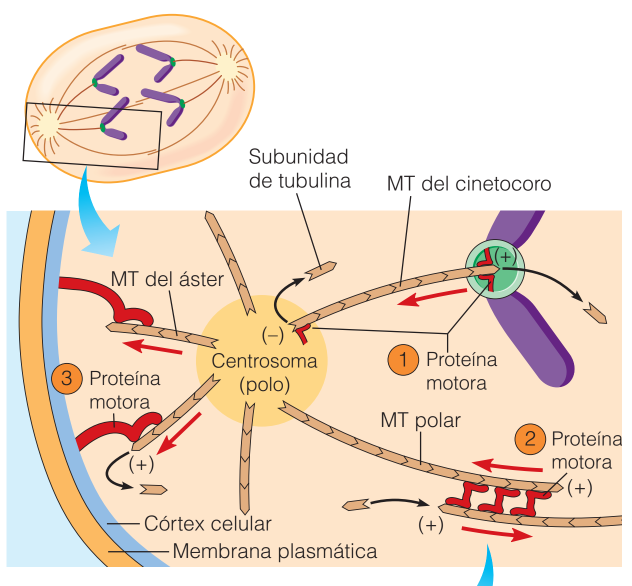
En el comienzo de la anafase, las dos cromátidas de cada cromosoma metafásico se separan y comienzan a desplazarse hacia los polos opuestos del huso. En este proceso de separación de las cromátidas, parecen estar implicadas varias moléculas. Una es la enzima topoisomerasa II, que se sitúa cerca del centrómero y que produce cambios en el superenrollamiento del DNA. En células mutantes que carecen de topoisomerasa II, las cromátidas hermanas intentan separarse en el comienzo de la anafase, pero se desgarran y se dañan, en vez de segregarse correctamente. La separación de las cromátidas incluye también cambios en las proteínas de adhesión que mantienen unidas las cromátidas hermanas antes del inicio de la anafase. Como veremos más adelante en este capítulo, la degradación de las proteínas de adhesión permite la separación de las cromátidas hermanas al comienzo de la anafase.

Proteínas motoras y movimiento de los cromosomas. Una vez que las cromátidas hermanas de cada cromosoma metafásico se han separado, se comportan como dos cromosomas independientes que se mueven hacia polos opuestos del huso. El estudio de los mecanismos subyacentes a este movimiento ha provocado el descubrimiento de distintas **proteínas motoras** que participan activamente en la mitosis. Como hemos visto en los Capítulos 15 y 16, las proteínas motoras utilizan la energía procedente del ATP para cambiar su forma, lo que produce que sean capaces de ejercer una fuerza suficiente para mover a las estructuras que tengan unidas. Las proteínas motoras desempeñan al menos tres funciones distintas en el movimiento de los cromosomas anafásicos.

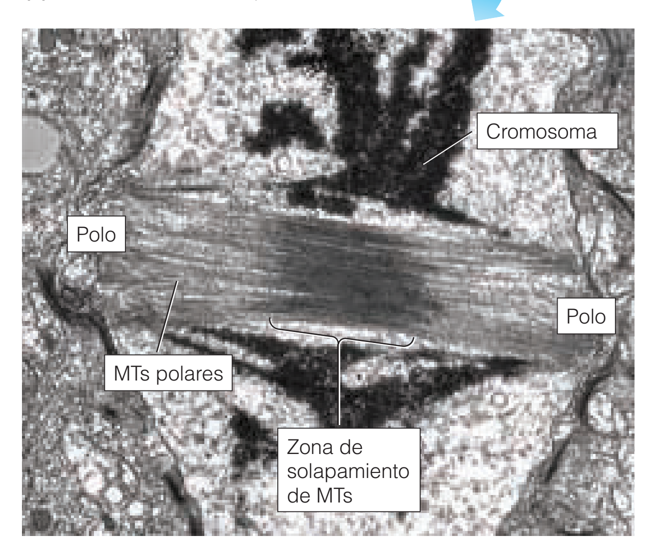
La primera función está relacionada con el mecanismo que mueve los cromosomas, con el cinetocoro por delante, hacia los polos del huso durante la anafase A. Como indica la Figura 19.27a (①), este tipo de movimiento de los cromosomas está dirigido por proteínas motoras asociadas con los microtúbulos del cinetocoro. En estudios recientes se ha sugerido que éstas son proteínas motoras especializadas, pertenecientes a la familia de las *quinesinas.* Pero en lugar de moverse a lo largo de la superficie de los microtúbulos, como las quinesinas que se describieron en el Capítulo 16, las quinesinas que dirigen el movimiento de los cromosomas se unen al extremo de un microtúbulo y promueven su despolimerización. Dos de estas proteínas motoras parecidas a la quinesina están implicadas en el movimiento de los cromosomas hacia los polos del huso: una se localiza en el extremo *más* y la otra en el extremo *menos* de los microtúbulos del cinetocoro. La que se encuentra en el extremo *más*, está inmersa en el cinetocoro, donde induce la despolimerización del microtúbulo y consecuentemente, desplaza el cromosoma hacia el polo del huso a medida que «se come» el extremo *más* del microtúbulo. Al mismo tiempo, la proteína motora situada en el extremo *menos*, está embebida en el polo del huso, donde induce la despolimerización del microtúbulo y por lo tanto, «enrolla» los microtúbulos y los cromosomas unidos a ellos.

Varios resultados experimentales apoyan la idea de que la despolimerización de los microtúbulos desempeña un papel crucial en el movimiento de los cromosomas. Por ejemplo, si se tratan células con la droga *taxol*, que inhibe la despolimerización de los microtúbulos, los cromosomas no se desplazan hacia los polos del huso. Por otra parte, la exposición de las células a un aumento de la presión, que aumenta la tasa de despolimerización de los microtúbulos, hace que los cromosomas se muevan más rápidamente hacia los polos. Finalmente, los anticuerpos que inhiben la actividad despolimerizante de las proteínas motoras situadas en el polo del huso, o de las proteínas motoras localizadas en el cinetocoro, impiden el movimiento de los cromosomas.

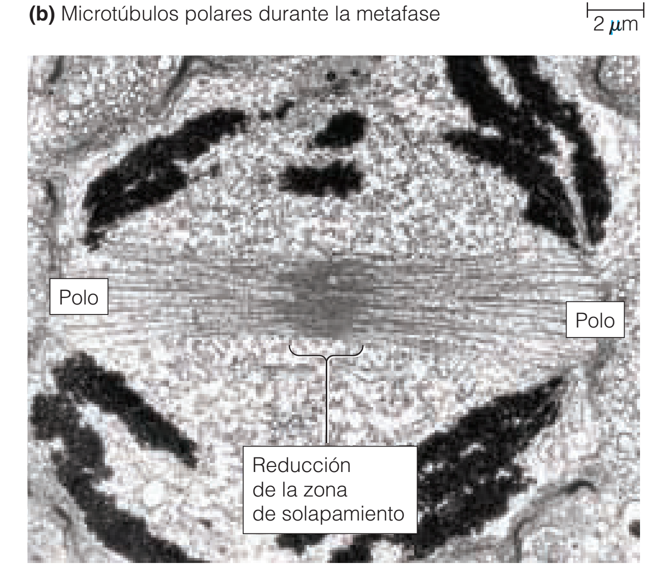
La segunda función que llevan a cabo las proteínas motoras, tiene que ver con la separación de los polos del huso entre sí, durante la anafase B. En este caso, las proteínas motoras asociadas con los microtúbulos polares (Figura 19.27a, ②) hacen que los microtúbulos que provienen de polos opuestos del huso se deslicen uno sobre otro, lo que produce la separación de los polos. A medida que los microtúbulos se deslizan, se alargan, gracias a la incorporación de subunidades de tubulina en sus extremos *más*, situados cerca del centro del huso, donde coinciden los microtúbulos provenientes de ambos polos. Se puede inducir experimentalmente el deslizamiento de los MTs, mediante el tratamiento con ATP de husos aislados, lo que indica que las



(a) Tres funciones de las proteínas motoras



(b) Microtúbulos polares durante la metafase



(c) Microtúbulos polares durante la anafase

proteínas motoras utilizan la energía derivada de la hidrólisis del ATP, para lograr que los microtúbulos que solapan, se deslicen uno sobre otro. Se piensa que las proteínas que estabilizan las parejas de microtúbulos polares antiparalelos mediante puentes cruzados, son los motores moleculares que empujan a los microtúbulos en direcciones opuestas, provocando la separación de los polos del huso. Durante la anafase B, esta actividad motora puede constituir la fuerza primaria que alarga el huso, mientras que el alargamiento de los microtúbulos polares es secundario. Las Figuras 19.27b y c muestran imágenes de microscopía electrónica que prueban la existencia del deslizamiento entre microtúbulos polares solapantes durante la anafase B.

El tercer tipo de fuerza producida por las proteínas motoras durante la anafase, implica a un grupo de motores asociados a los microtúbulos del áster (Figura 19.27a, ③). Estas proteínas motoras unen los extremos *más* de los microtúbulos del áster al *córtex celular*, la capa de microfilamentos de actina que bordea la superficie interna de la membrana plasmática. Se cree que las proteínas motoras de áster, ejercen una fuerza de atracción sobre el huso que, junto con la fuerza de empuje generada por las proteínas motoras que forman los puentes cruzados entre los microtúbulos polares, ayudan a separar los polos del huso durante la anafase B en algunos tipos celulares.

Figura 19.27 Motores mitóticos. (**a**) Modelo de movimiento de los cromosomas mitóticos, basado en las tres funciones que desempeñan las proteínas motoras. Las proteínas motoras se señalan en rojo, y las flechas rojas pequeñas indican la dirección del movimiento generado por estas proteínas. Las proteínas motoras se asocian con tres tipos de microtúbulos: los MTs del cinetocoro, los MTs polares y los MTs del áster. ① En los MTs del cinetocoro, las proteínas motoras se unen, tanto a sus extremos *más* (inmersas en el cinetocoro del cromosoma), como a los extremos *menos* (situadas en el centrosoma del huso mitótico). Las proteínas motoras situadas en el cinetocoro, «se comen» (es decir, despolimerizan) los extremos *más* de los microtúbulos del cinetocoro. Con esto se consigue que el cromosoma se vea empujado hacia el polo del huso a medida que los MTs del cinetocoro se acortan por la pérdida de subunidades de tubulina. Al mismo tiempo, las proteínas motoras situadas en el polo del huso, despolimerizan los extremos *menos* de los MTs del cinetocoro, tirando de dichos MTs y, en consecuencia, de los cromosomas unidos a ellos. ② Las proteínas motoras forman puentes cruzados entre los MTs polares y hacen que se deslicen uno sobre otro, forzando a los polos del huso a separarse. A medida que los MTs polares se deslizan, se produce su alargamiento mediante la incorporación de subunidades de tubulina a sus extremos *más*, que se encuentran cerca del centro del huso. ③ Las proteínas motoras de los MTs del áster, unen los extremos *más* de los MTs del áster al córtex celular y tiran de los polos del huso, induciendo la despolimerización de los MTs del áster en sus extremos *más*. (**b** y **c**). Estas dos micrografías electrónicas proporcionan pruebas del deslizamiento de los MTs polares, inducido por proteínas motoras asociadas a éstos. Durante la metafase, los MTs polares se encuentran notablemente solapados. Durante la anafase, las proteínas motoras provocan el deslizamiento de los MTs polares en direcciones opuestas, reduciéndose la zona de solapamiento.

En la mitosis, por lo tanto, participan tres grupos independientes de proteínas motoras, que actúan sobre los microtúbulos del cinetocoro, los microtúbulos polares y los microtúbulos del áster, respectivamente (Figura 19.27a). La contribución relativa de las fuerzas de atracción y empuje desarrolladas por estos tres grupos de proteínas motoras, difieren entre organismos. Por ejemplo, en las diatomeas y en las levaduras, el empuje (deslizamiento) de unos microtúbulos sobre otros de polaridad opuesta es particularmente importante durante la anafase B. En algunos hongos, por el contrario, la fuerza principal que opera en sus células, es la atracción ejercida desde los ásteres. En las células de los vertebrados, seguramente funcionen ambas fuerzas, aunque la atracción desde los ásteres quizá desempeñe un papel más importante, en especial durante la formación del huso.

La citocinesis divide el citoplasma

Después de que los dos grupos de cromosomas se hayan separado durante la anafase, la citocinesis divide el citoplasma en dos, y completa el proceso de división celular. La citocinesis comienza habitualmente durante la anafase tardía o la telofase temprana, mientras se están volviendo a formar la envuelta nuclear y el nucleolo, y los cromosomas se están descondensando. Sin embargo, la citocinesis y la mitosis no se encuentran necesariamente ligadas. En algunas ocasiones, existe un retraso significativo entre la división nuclear (mitosis) y la citocinesis, lo que indica que ambos procesos no están íntimamente acoplados. Es más, muchos tipos celulares pueden sufrir varios ciclos de replicación de los cromosomas y de división nuclear sin que tenga lugar la citocinesis, produciéndose de esta manera grandes células multinucleadas. En ciertos casos, esta situación de multinucleación es permanente, mientras que en otros casos, es sólo una fase temporal durante el desarrollo del organismo. Esto es lo que sucede, por ejemplo, durante el desarrollo de un tejido de la semilla de los vegetales denominado *endospermo* en los granos de los cereales. Aquí, la división nuclear tiene lugar durante cierto tiempo sin estar acompañada de la citocinesis posterior, formándose varios núcleos que comparten un mismo citoplasma. Después ocurren varios ciclos de citocinesis sin mitosis, tabicando los muchos núcleos en células del endospermo separadas. Un proceso similar tiene lugar durante el desarrollo de los huevos de insectos. El huevo fecundado experimenta mitosis, pero no citocinesis, y enseguida se encuentra compuesto de muchos núcleos con un único citoplasma; después la citocinesis se pone al día.

A pesar de estos casos, en la mayoría de las ocasiones, la citocinesis acompaña o sucede inmediatamente después de la mitosis, asegurándose así que cada núcleo hijo obtenga su propio citoplasma y se convierta en una célula independiente.

La citocinesis en las células animales. El mecanismo de la citocinesis en animales y vegetales es bastante diferente. En las células animales, la citocinesis recibe el nombre de **segmentación**. Este proceso comienza como una pequeña invaginación o pliegue en la superficie celular, que se profundiza formando un **surco de segmentación,** que rodea la célula, como ocurre en el huevo fecundado de la rana que se muestra en la Figura 19.28. (La segmentación se ha estudiado con detalle en los huevos de rana y de erizos de mar.) El surco continúa profundizando hasta que entran en contacto las superficies opuestas y la célula se divide en dos. El surco de segmentación divide a la célula según un plano que pasa por la región central del huso (el *ecuador del huso*), lo que sugiere que la posición del huso determina el lugar donde se dividirá el citoplasma. Esta idea se ha explorado experimentalmente desplazando el huso mitótico mediante agujas de cristal muy pequeñas o fuerzas gravitacionales generadas por centrifugación. Si el huso mitótico era movido antes del final de la metafase, la orientación del plano de segmentación cambiaba, de tal manera que era definido por la nueva situación del ecuador del huso. Sin embargo, si el huso se movía una vez que la metafase se había completado, el plano de segmentación pasaba por el área que ocupaba originalmente el ecuador del huso. Por lo tanto, el lugar de la división citoplásmica debe programarse al final de la metafase.

Surco de segmentación

100 μm

Figura 19.28 Citocinesis en una célula animal. Micrografía electrónica de un huevo fecundado de rana, capturado en el momento de su división. El surco de segmentación es claramente visible como una constricción hacia el interior de la membrana plasmática. Dentro de la célula, la mitosis ya está casi finalizada, así que el surco de segmentación dividirá los dos grupos de cromosomas a medida que continúa deprimiendo la membrana.

La segmentación depende de un haz de microfilamentos de actina que forman algo parecido a un cinturón, denominado **anillo contráctil**, que se forma justo debajo de la membrana plasmática durante la anafase temprana. El examen al microscopio electrónico del anillo contráctil revela la existencia de muchos filamentos de actina que orientan su eje de forma paralela al surco. A medida que la segmentación progresa, este anillo de microfilamentos se tensa alrededor del citoplasma, como un cinturón alrededor de la cintura, y que finalmente dividirá la célula en dos. El tensado del anillo contráctil se hace gracias a la interacción entre los microfilamentos de actina y la proteína *miosina*. (Como hemos visto en el Capítulo 16, la miosina es la proteína que interacciona con la actina para producir la contracción.) Durante la segmentación, el anillo contráctil se comporta como una estructura dinámica en la que la polimerización y la depolimerización de la actina, junto con las interacciones con la miosina, dirigen contracción.

El anillo contráctil representa un buen ejemplo de la rápidez con que los complejos de actina-miosina pueden ser ensamblados y desensamblados en células no musculares. La polimerización de los monómeros de actina en filamentos tiene lugar justo después de la invaginación del surco de segmentación, y toda la estructura se desmonta de nuevo poco después de que haya finalizado la citocinesis. Los monómeros de actina que se usan para formar los microfilamentos del anillo contráctil se obtienen del desmantelamiento de los filamentos de actina del citoesqueleto, de la misma manera que los microtúbulos del huso mitótico se forman con la tubulina de los microtúbulos del citoesqueleto.

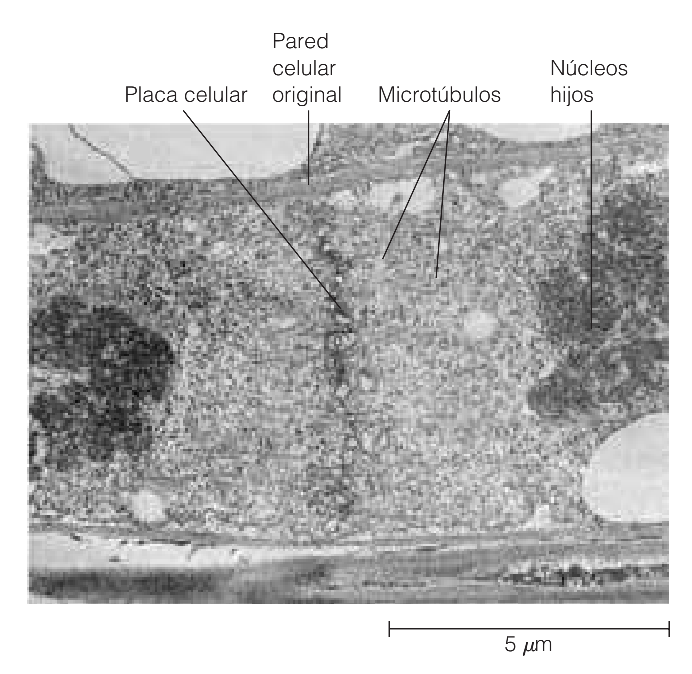


Figura 19.29 La citocinesis y la formación de la placa celular en una célula vegetal. Esta micrografía electrónica muestra una célula vegetal en la telofase tardía. Los núcleos hijos, con sus juegos de cromosomas, son parcialmente visibles como un material oscuro en los extremos izquierdo y derecho de la micrografía, y la placa celular en formación, se observa como una línea de vesículas en la región media de la célula. Los microtúbulos del fragmoplasto se orientan perpendicularmente a la placa celular. La célula pertenece a un ejemplar de *Acer saccharinum*, el arce del azúcar (TEM).

Citocinesis en células vegetales. La citocinesis en las plantas superiores se diferencia de la citocinesis de las células animales por un hecho fundamental. Dado que las células vegetales están rodeadas de una pared celular rígida, no pueden crear un anillo contráctil en la superficie celular que separe la célula en dos. En su lugar, se dividen fabricando una membrana plasmática y una pared celular alrededor de los dos núcleos hijos (Figura 19.29). En otras palabras, en vez de separar el citoplasma por la mitad con un anillo contráctil que progresa desde el exterior celular hacia el interior, el citoplasma de la célula vegetal se divide por un proceso que comienza en el interior celular y que progresa hacia la periferia.

La citocinesis en los vegetales se inicia durante la anafase tardía o la telofase temprana, cuando un grupo de pequeñas vesículas que proceden del complejo de Golgi, se alinean a lo largo del ecuador del huso. Estas vesículas, que contienen polisacáridos y glicoproteínas necesarias para la formación de la pared celular, son dirigidas al ecuador del huso por el **fragmoplasto**, un grupo de microtúbulos paralelos derivados de los microtúbulos polares y que están orientados perpendicularmente a la dirección en la que se va formando la nueva pared celular. Después de su llegada al ecuador, las vesículas derivadas del complejo de Golgi se fusionan para formar un gran saco aplastado, denominado **placa celular**, que representa la pared celular en proceso de formación. El contenido del saco se junta para formar la parte no celulósica de la pared celular primaria, que se expande hacia fuera al mismo tiempo que se forman microtúbulos y vesículas en los laterales de la placa celular que va avanzando. Al final, la placa celular en expansión contacta con la pared celular original, separándose de esta manera las células hijas entre sí. La nueva pared celular se completa posteriormente mediante la deposición de microfibrillas de celulosa. Los plasmodesmos que forman canales de continuidad entre los citoplasmas de las células vegetales adyacentes también están presentes en la placa celular y en la nueva pared a medida que se forman.

Dado que el plano de división pasa por el ecuador del huso en células animales y vegetales, los dos juegos de cromosomas situados en los polos del huso se separan en dos células hijas en el momento de la división. Si el huso se forma simétricamente en la célula, como hace normalmente, la citocinesis será también simétrica y los orgánulos más pequeños se repartirán equitativamente entre las dos células hijas. Los orgánulos más grandes, como el retículo endoplásmico o el complejo de Golgi, tienden a fragmentarse en pequeñas vesículas en el incio de la mitosis y después se

vuelven a reunir en las células hijas, asegurando al menos un reparto más o menos equitativo de los componentes celulares.

Pero existen casos en los que la citocinesis no divide el citoplasma de una manera equitativa. Por ejemplo, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la célula interfásica produce una pequeña yema que se resalta antes de que la célula entre en mitosis. El huso mitótico se forma en el área del citoplasma de la yema, y la citocinesis divide posteriormente el citoplasma de una manera muy asimétrica, formando una célula grande y otra muy pequeña. También se observan divisiones asimétricas en las hembras de algunos animales durante el desarrollo de los óvulos a partir de las células precursoras conocidas como *oocitos*. En este caso, la citocinesis divide al citoplasma desigualmente, de manera que la célula destinada a convertirse en el óvulo, recibe todo el citoplasma del oocito original. Así, el citoplasma, que en otro caso habría sido distribuido en muchas células, se concentra en un solo gameto, maximizando la cantidad de nutrientes almacenados.

Regulación del ciclo celular

Anteriormente hemos descrito en este capítulo, un ciclo celular típico de una célula eucariota en la que las fases G1, S, G2 y M se sucedían una a otra. Este patrón es con frecuencia el que se da en los organismos en crecimiento o en células en cultivo que no tienen limitación de espacio o falta de nutrientes. Pero también pueden existir variaciones, especialmente en la duración total del ciclo, la duración relativa de las distintas fases del ciclo, y en la inmediatez con la que la citocinesis sucede a la mitosis. Esta variabilidad pone de manifiesto que el ciclo celular debe de estar regulado de alguna manera para satisfacer las necesidades de un tipo celular en concreto o de toda la especie. Las base molecular de esta regulación es un tema de gran interés, no sólo para lograr comprender los ciclos vitales de las células normales, sino también para conocer cómo las células cancerosas consiguen escapar a los mecanismos de control normales. Actualmente, la investigación de la regulación del ciclo celular es una de las áreas más activas de la biología, y ha comenzado a desvelar alguno de los mecanismos moleculares subyacentes al ciclo celular.

La duración del ciclo celular varía en los diferentes tipos celulares

Algunas de las variaciones más frecuentes encontradas en el ciclo celular, conciernen al tiempo de generación. En los organismos pluricelulares, los tiempos de generación varían enormemente en función del tipo celular y de la función que desempeñe en el organismo. Algunas células se dividen rápida y continuamente a lo largo de la vida de un organismo, como un medio de reemplazar a las células que están siendo destruidas o perdidas de manera continua. Dentro de esta categoría entran las células implicadas en la formación del esperma, y las células madre que dan lugar a células sanguíneas, cutáneas y a las células epiteliales que tapizan la cavidad interna de órganos como el pulmón o el intestino. Las células madre humanas pueden tener tiempos de generación tan cortos como 8 horas.

En contraposición, las células de los tejidos de crecimiento lento pueden tener tiempos de generación de varios días o más, y algunas células, como las células nerviosas maduras o las células musculares, no se dividen jamás. También existen otros tipos celulares que no se dividen en circunstancias normales pero que pueden ser inducidas a hacerlo con un estímulo adecuado. Las células hepáticas entran dentro de esta categoría; no proliferan normalmente en el hígado maduro pero pueden hacerlo si se extrae quirúrgicamente una parte del hígado. Los linfocitos (glóbulos blancos) constituyen otro ejemplo; cuando se exponen a una proteína extraña, comienzan a dividirse como parte de la respuesta inmune.

La mayor parte de estas variaciones en el tiempo de generación están basadas en diferencias en G1, aunque la fase S o la G2 también pueden variar en cierta manera. Las células que se dividen muy lentamente pueden invertir días, meses e incluso años en el período quiescente de G1 conocido como G0, mientras que una célula que se divide rápidamente tiene una fase G1 muy corta o incluso inexisente. Las células embrionarias de los insectos, anfibios, y de otros animales no mamíferos son buenos ejemplos de células con ciclos celulares muy cortos, sin fase G1 y con una fase S muy corta. Por ejemplo, durante el desarrollo embrionario de anfibios como la rana *Xenopus laevis*, el ciclo celular dura menos de 30 minutos, pese a que en los tejidos adultos dure cerca de 20 horas. En estas condiciones, la fase S se completa en menos de 3 minutos, al menos 100 veces más rápidamente que en los tejidos adultos. La alta tasa de síntesis de DNA rápida que se necesita para mantener un ciclo celular tan acelerado es posible porque se aumenta el número total de replicones, disminuyendo de esta manera la cantidad de DNA que debe sintetizar cada replicón. Es más, todos los replicones se activan al mismo tiempo, a diferencia de la activación secuencial que se observa en los tejidos adultos.

Además, estas células embrionarias no tienen prácticamente necesidad de sintetizar otros componentes diferentes al DNA, ya que el huevo fecundado es una célula muy grande con suficiente citoplasma como para soportar varios ciclos de división celular. Cada ciclo de división subdivide el citoplasma inicial en células cada vez más pequeñas, hasta que se alcanza el tamaño celular típico del adulto (Figura 19.30). Esto significa que el crecimiento celular no necesita formar parte del ciclo celular. Como resultado, no sólo falta la fase G1 sino que la fase G2 es también muy corta, lo que permite que las células pasen casi directamente de la síntesis de DNA a la mitosis, y vuelvan después a la síntesis. De hecho, la fase S comienza incluso antes de que la mitosis fi-

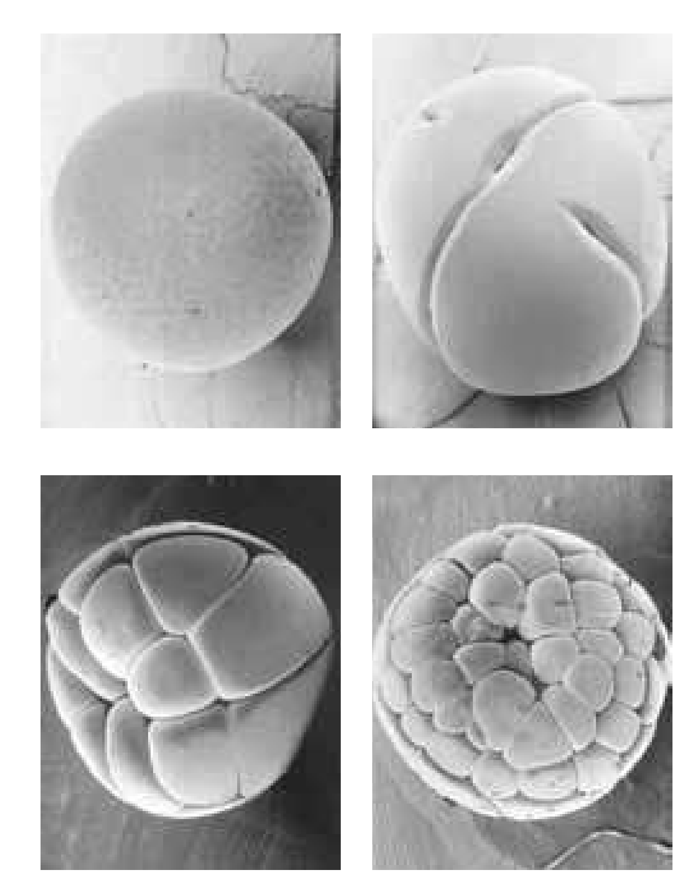


Figura 19.30 Segmentación de un huevo fecundado, en células cada vez más pequeñas. Los huevos de anfibios son muy grandes, con suficiente citoplasma como para soportar varios ciclos de división celular después de la fertilización. Cada ciclo de división durante el desarrollo temprano fragmenta el citoplasma en células más pequeñas. (© R.G. Kessel y Dr. Gene Shih/Visuals Unlimited).

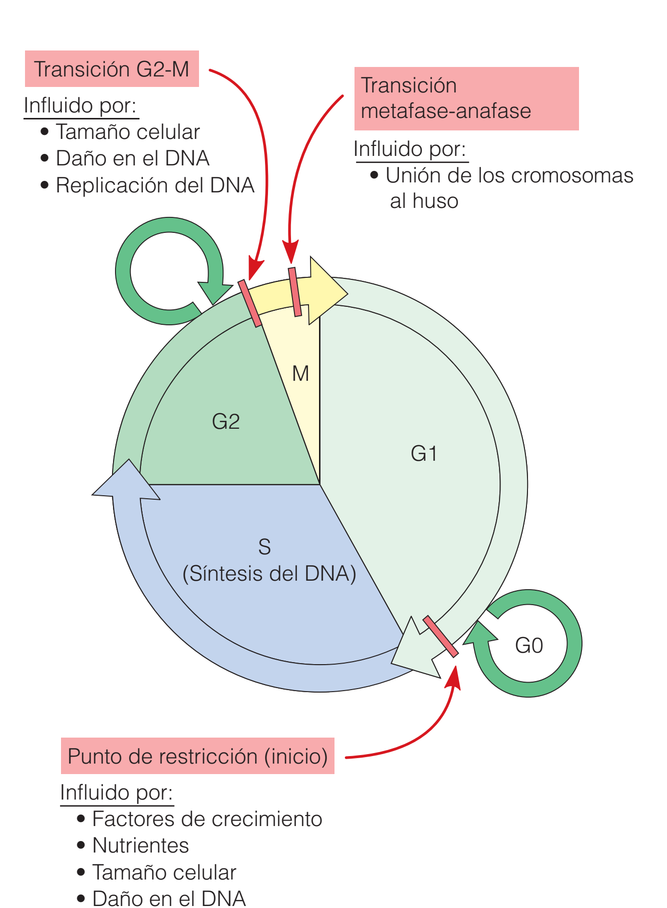


Figura 19.31. Puntos de transición claves en el ciclo celular. Los rectángulos rojos señalan tres puntos de transición importantes en el ciclo celular de eucariotas, donde los mecanismos de control determinan si una célula continúa o no avanzando a lo largo del ciclo. Esta determinación está basada en señales químicas que reflejan tanto el estado interno de la célula, como su ambiente externo. Las dos flechas circulares verdes oscuras indican los puntos de G1 tardía y de G2 tardía, donde la célula puede salir del ciclo y adoptar un estado de no división.

nalice. En estos ejemplos, sabemos que el crecimiento celular durante la fase G1 y G2 no es un requisito indispensable para la división celular, aunque el crecimiento y la división celular son fenómenos que están normalmente acoplados.

La evolución a través del ciclo celular está controlada en varios puntos clave de transición

El sistema de control que regula la progresión a través del ciclo celular debe cumplir varias funciones. En primer lugar, debe asegurar que los eventos relacionados con cada fase del ciclo se lleven a cabo en el momento apropiado y en la secuencia adecuada. Segundo, debe asegurar que cada fase del ciclo se ha completado adecuadamente antes de que se inicie la siguiente fase. Por último, debe ser capaz de responder a condiciones externas que señalen la necesidad de crecer o de dividirse (por ejemplo, a la cantidad de nutrientes disponibles o a la presencia de moléculas que estimulen el crecimiento).

Los objetivos anteriores son llevados a cabo por un grupo de moléculas que actúan como puntos de transición claves en el ciclo celular (Figura 19.31). El primero de estos puntos de control sucede durante la fase G1. Ya hemos visto que la fase G1 es la más variable entre los distintos tipos celulares, y que las células de mamíferos que han dejado de dividirse, quedan detenidas en esta fase. Por ejemplo, en las células en cultivo podemos parar o frenar el proceso de división celular permitiendo que las células agoten el espacio o los nutrientes, o incorporando en el medio inhibidores de procesos vitales como la síntesis proteica. En estos casos, la célula se detiene en la fase G1 tardía, lo que sugiere que la entrada en S desde G1 es un punto crítico en el control del ciclo celular. En las levaduras, se conoce a este punto de control como **Star** (inicio en inglés); las levaduras deben tener suficientes nutrientes y deben alcanzar un determinado tamaño antes de que puedan pasar de Start. En las células animales, el punto de control análogo se denomina **punto de restricción**. La capacidad de traspasar el punto de restricción viene determinado en gran medida por la presencia extracelular de *factores de crecimiento*, que son proteínas

que usan los organismos pluricelulares para estimular o inhibir la proliferación celular. Las células que han pasado con éxito el punto de restricción, entran en la fase S, mientras que las que no lo pasan, entran en G0 y permanecen allí durante periodos de tiempo variables, esperando una señal que les permita volver a entrar en G1 y pasar el punto de restricción.

En la transición G2-M hay un segundo punto de transición importante, relacionado con el compromiso de entrar en mitosis. En algunos tipos celulares, el ciclo celular puede bloquearse indefinidamente al final de G2, si no es necesaria la división celular; en estas condiciones, la célula entra en un estado de no división análogo a G0. La regulación de la tasa de división celular mediante la parada del ciclo, durante la fase G2 tardía o G1 tardía, varía según los organismos y el tipo celular. En general, la detención del ciclo en la fase G1 tardía (en el punto de restricción) es el control más habitual en los organismos pluricelulares. Pero en unos pocos casos, como en la división de los huevos fecundados de la rana o en algunas células cutáneas, la detención en G2 es más importante.

Un tercer punto de transición clave en el ciclo celular, aparece en la transición de la metafase a la anafase, donde el objetivo consiste en segregar los cromosomas en dos células hijas y salir de la mitosis. Antes de que la célula traspase este punto de transición y comience la anafase, es importante que todos los cromosomas se encuentren unidos al huso. Si las dos cromátidas que conforman cada cromosoma no están unidas adecuadamente a los polos opuestos del huso, el ciclo celular se detendrá momentáneamente para permitir que se produzca tal unión. En ausencia de este mecanismo, no existen garantías de que cada célula hija formada reciba un juego completo de cromosomas.

El comportamiento de la célula en los distintos puntos de transición está condicionado, tanto por la finalización correcta de los procesos precedentes del ciclo (por ejemplo, la unión de los cromosomas al huso), como por factores presentes en el ambiente celular (por ejemplo, los nutrientes o los factores de crecimiento). Pero independientemente de las influencias particulares, la progresión a lo largo del ciclo celular está mediada por un grupo de moléculas relacionadas, que se activan o inhiben unas a otras, en cadenas de interacciones, que pueden ser muy elaboradas. A continuación, describiremos cómo se identificaron estas moléculas de control y las funciones que llevan a cabo.

El estudio de la fusión celular y de mutaciones en el ciclo celular llevaron a la identificación de las moléculas que controlan el ciclo

La primera pista acerca de la identidad de las moléculas que dirigen la progresión a través del ciclo celular, proceden de experimentos de fusión celular desarrollados en los primeros años de la década de los 70. En los primeros estudios, se fusionaron dos células de mamífero en cultivo que se encontraban en diferentes fases del ciclo celular para formar una única célula con dos núcleos, un *heterocarionte*. Como indica la Figura 19.32a, si una de las células originales se encuentra en la fase S y la otra en la fase G1, el núcleo de la G1 en el heterocarionte inicia rápidamente la síntesis de DNA, aun en el caso de que, en condiciones normales, no alcanzaría la fase S hasta muchas horas después. Estas observaciones indican que las células en la fase S contienen una o más moléculas que desencadenan la progresión de G1 a S. Las moléculas controladoras no son enzimas implicadas en la replicación del DNA, ya que estas enzimas pueden encontrarse en concentraciones elevadas en las células que no entran en la fase S.

Los experimentos de fusión celular se han desarrollado también entre células que estaban sufriendo la mitosis y células en interfase, tanto en G1, como en S, o en G2. Después de la fusión, el núcleo de la célula en interfase es inmediatamente conducido a las fases iniciales de la mitosis, incluyendo la condensación de la cromatina, la formación del huso y la fragmentación de la envuelta nuclear. Así, si la célula en interfase se encontraba en G1, los cromosomas, no duplicados, se condensaban (Figura 19.32b).

Los experimentos anteriores sugieren que hay determinadas moléculas presentes en el citoplasma, que conducen a las células de la fase G1 a la fase S y de G2 a la mitosis. Algunos estudios genéticos desarrollados con levaduras permitieron un gran avance en la identificación de dichas mo-

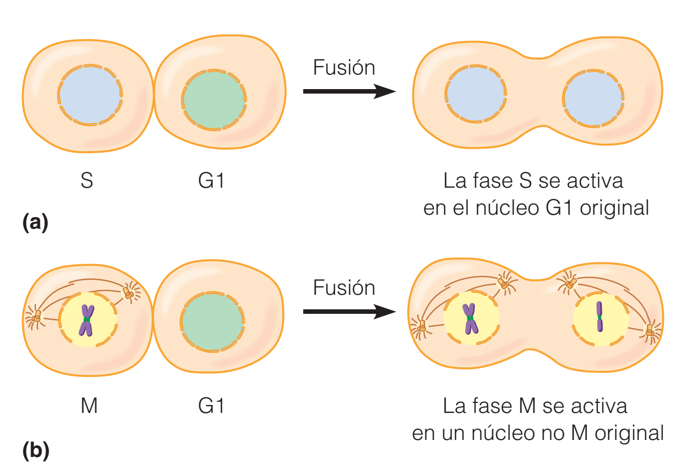


Figura 19.32 La fusión celular pone de manifiesto el papel de las señales químicas citoplásmicas en la regulación del ciclo celular. Se puede obtener una información importante de los experimentos en los que se induce a fusionarse a dos células, que se encuentran en puntos diferentes del ciclo celular, obligándolas a formar una sola célula con dos núcleos, un heterocarionte. La fusión celular se puede conseguir por varios métodos, como la adición de ciertos virus o de polietilen glicol, o la aplicación de un breve pulso eléctrico, que causa la desestabilización momentánea de las membranas (electroporación). (**a**) Si se fusionan células en la fase S y células en la fase G1, la síntesis de DNA comienza en el núcleo G1 original, lo que sugiere que una sustancia que activa la fase S está presente en la célula en fase S. (**b**) Si se fusiona una célula en fase M con otra en cualquier otra fase, esta última célula entra en mitosis rápidamente. Si la célula se encontraba en G1, los cromosomas condensados parecen no replicarse y tienen, por tanto, a una única cromátida.

léculas de control del ciclo celular. Dado que son organismos unicelulares que crecen rápidamente y que pueden ser estudiados bajo condiciones de laboratorio definidas, las levaduras constituyen un modelo ideal para la investigación de los genes implicados en el control del ciclo celular.

El genetista Leland Hartwell, trabajando con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, fue pionero en el desarrollo de técnicas para la identificación de mutantes de levaduras que se habían quedado «clavadas» en algún punto del ciclo celular. Podría esperarse que la mayor parte de dichos mutantes fuesen difíciles o imposibles de estudiar, porque el bloqueo de su ciclo celular impide que se reproduzcan. Pero Hartwell solucionó este obstáculo potencial con una estrategia muy acertada, el uso de mutantes sensibles a la temperatura. Como se ha mencionado anteriormente en este capítulo, ésta es una mutación cuyos efectos perniciosos sólo aparecen cuando se sobrepasa el rango normal de temperatura del organismo. Así, una levadura que porte una mutación sensible a la temperatura puede ser cultivada a una temperatura menor («permisiva»), mientras que el ciclo celular se vea bloqueado a temperaturas más altas. Presumiblemente, la proteína codificada por el gen mutante del ciclo celular, es lo suficientemente parecida al producto génico normal, para poder funcionar a temperaturas más bajas, mientras que el aumento de la temperatura, altera su conformación, siendo ahora inactiva.

Utilizando esta estrategia, Hartwell y sus colaboradores identificaron muchos genes implicados en el ciclo celular de *S. cerevisiae* y establecieron en qué momento del ciclo operaban sus productos. Previsiblemente, resultó que muchos de estos genes producían proteínas de replicación del DNA, pero parecía que otras participaban en la regulación del ciclo celular. Paul Nurse hizo un descubrimiento innovador, cuando realizó un estudio similar con la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. Identificó un gen denominado *cdc2*, cuya actividad es necesaria para la iniciación de la mitosis, es decir, para hacer que las células rebasen la transición G2-M (el acrónimo *cdc* hace referencia a cell division cycle, que significa ciclo de división celular). Al poco, se encontraron genes homólogos al gen *cdc* en todas las células eucariotas estudiadas. Cuando se examinaron las propiedades de la proteína producida por el gen *cdc*, se descubrió que era una proteín-quinasa, es decir, una enzima que cataliza la transferencia de un grupo fosfato del ATP a otras proteínas. Este descubrimiento abrió las puertas a la solución de los misterios del ciclo celular.

La progresión a través del ciclo celular está controlada por quinasas dependientes de ciclina (Cdks)

La fosforilación de proteínas diana por protein quinasas, y su desfosforilación por enzimas denominadas *proteín fosfatasas*, es un mecanismo habitual de regulación de la actividad proteica, usado regularmente en el control del ciclo celular. La progresión a través del ciclo celular, está dirigida por una serie de protein quinasas, incluyendo la proteín quinasa producida por el gen *cdc2*, que tienen actividad enzimática únicamente cuando están unidas a un tipo especial de proteína activadora llamada **ciclina**. Por tanto, se conocen a estas proteínas como **quinasas dependientes de ciclina** o simplemente **Cdks**. El ciclo celular eucariota está controlado por varias Cdks diferentes que se unen a diferentes ciclinas, formando por lo tanto una gran variedad de complejos Cdks-cicilinas.

Como su mismo nombre indica, las ciclinas son proteínas cuya concentración oscila elevándose y reduciéndose, permitiendoles así controlar la actividad de varias Cdks en diferentes puntos del ciclo celular. Las ciclinas requeridas para la transición G2-M y los procesos iniciales de la mitosis se denominan *ciclinas mitóticas*, y las Cdks a las que se unen se conocen como *Cdks mitóticas*. De igual manera, las ciclinas que se necesitan para traspasar el punto de restricción G1 (o Start) se llaman *ciclinas G1*, y las Cdks a las que se unen se conocen como *Cdks G1*. Existe aún otro grupo de ciclinas, las llamadas *ciclinas S*, que se requieren en los procesos asociados con la replicación del DNA durante la fase S.

Si la progresión a través de los puntos críticos del ciclo celular está controlada por un grupo de Cdks y ciclinas diferentes, interaccionando en combinaciones variadas, ¿cómo se regula la actividad de estos complejos proteicos? La disponibilidad de las moléculas de ciclina, que se requieren para promover la actividad proteín quinasa de las Cdks, es uno de los niveles de control; otro de ellos es la fosforilación de las Cdks. Explicaremos ambos tipos de control estudiando más de cerca a la Cdk-ciclina mitótica, que controla la progresión de G2 a la mitosis.

El complejo Cdk-ciclina de la mitosis controla la progresión hacia la transición G2-M, mediante la fosforilación de proteínas clave implicadas en las fases tempranas de la división celular

La primera evidencia de la existencia de un mecanismo de control molecular que desencadenaba el inicio de la mitosis procede de experimentos desarrollados en los gametos de rana. Los gametos maduros se desarrollan por meiosis a partir de células precursoras denominadas *oocitos*. La meiosis es un tipo de división celular especial en el que se reduce a la mitad el número de cromosomas cuando el huevo o el espermatozoide se están formando (*véase* Capítulo 20). Durante el desarrollo del gameto, el ciclo celular se detiene poco después del comienzo de la meiosis, cuando el oocito se encuentra esperando ser estimulado por la hormona apropiada. El oocito completa después la mayoría de las fases de la meiosis, pero se detiene durante la metafase de la segunda división meiótica. Es ahora una célula huevo madura, capaz de ser fecundada. Un experimento crucial demostró que si se inyecta el citoplasma de una célula huevo madura en el citoplasma de un oocito inmaduro que está esperando la estimulación hormonal, el oocito entra inmediatamente en meiosis (Figura 19.33). Los investigadores propusieron la existencia de una sustancia química cito-

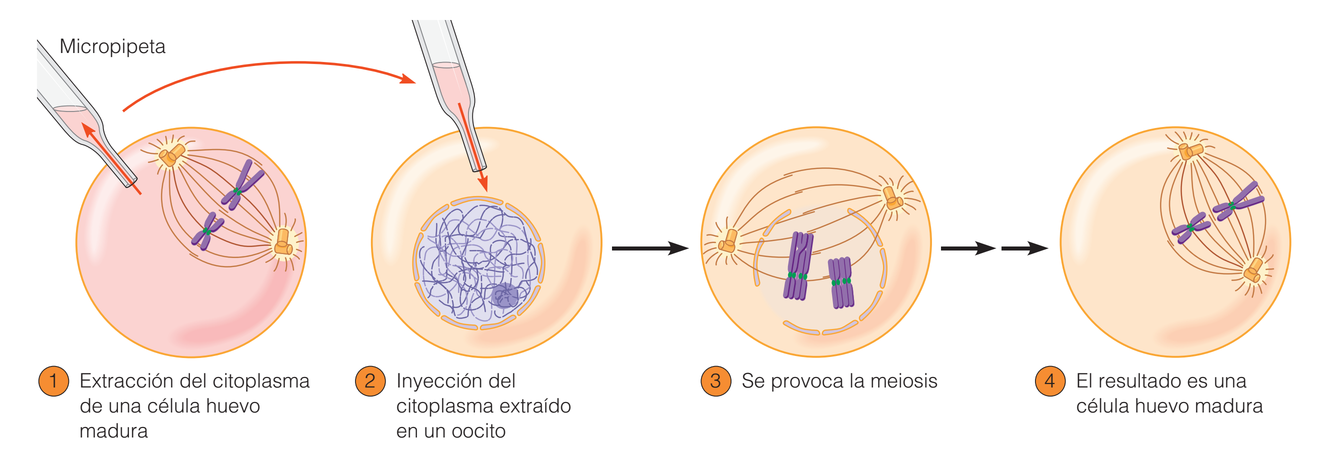


Figura 19.33 Prueba de la existencia de MPF. En la situación natural, las hormonas actúan sobre los oocitos de rana para provocar la meiosis y el desarrollo de gametos de rana maduros, que se detienen (hasta la fecundación) en la metafase de la segunda división meiótica. El experimento que se muestra aquí, desarrollado por Y. Masui y C.L. Markert en 1971, estableció la existencia de una sustancia implicada en este proceso; la llamaron factor promotor de la maduración (MPF). ① En su experimento, utilizaron una micropipeta para eliminar el citoplasma de una célula huevo madura, detenida en la metafase de la segunda división meiótica, y ② lo inyectaron en un oocito inmaduro. ③ El oocito entra en meiosis y ④ se convierte en una célula huevo madura. Este procedimiento experimental puede usarse para detectar y aislar a MPF. Se piensa que las hormonas que provocan la maduración del oocito, actúan promoviendo la síntesis o la activación de MPF. MPF es una Cdk-ciclina mitótica.

plásmica, que llamaron **MPF** (*maturation-promoting factor,* factor promotor de la maduración), que inducía la «maduración» del oocito (es decir, su división por meiosis).

En posteriores experimentos se demostró, que además de inducir la meiosis, MPF también desencadena la mitosis, cuando se inyecta en huevos fecundados de rana. Poco después se identificaron moléculas análogas en el citoplasma de una gran variedad de tipos celulares capaces de dividirse, como levaduras, invertebrados marinos y mamíferos. El estudio bioquímico de estas moléculas inductoras de la mitosis reveló que están formadas por dos subunidades: una Cdk y una ciclina. En otras palabras, MPF es un complejo *Cdk-ciclina mitótico.* Es más la parte correspondiente a Cdk de este complejo es casi idéntica al producto del gen *cdc2* de levaduras. De hecho, el gen humano que codifica para cdk puede sustituir perfectamente a un gen *cdc2* deficiente o ausente en las levaduras, ¡aun cuando el último ancestro común entre el hombre y las levaduras, vivió probablemente hace un billón de años!

Habiendo aclarado que MPF es una Cdk-ciclina mitótica que provoca el inicio de la mitosis en un amplio abanico de tipos celulares, surge la pregunta de cómo se controla la Cdk-ciclina para que sólo funcione en el momento apropiado, es decir, al final de G2. La disponibilidad de la misma cdk mitótica no responde a la pregunta, porque su concentración permanece constante a lo largo de todo el ciclo. Sin embargo, la cdk mitótica es sólo activa como proteín quinasa cuando se encuentra unida a la ciclina mitótica, y la ciclina mitótica no se encuentra siempre presente en las cantidades adecuadas. De hecho, la concentración de la ciclina mitótica aumenta gradualmente durante G1, S y G2; al final de la fase G2 alcanza un umbral crítico, que le permite activar a cdk mitótica y desencadenar, por lo tanto, el inicio de la mitosis (Figura 19.34). A mitad de la mitosis, las moléculas de ciclina son destruidas rápidamente. El descenso de la actividad de la cdk mitótica resultante, evita que ocurra otra mitosis hasta que la concentración de la ciclina mitótica vuelva a aumentar durante el siguiente ciclo celular.

Además de la ciclina mitótica, la activación de Cdks también requiere la fosforilación y desfosforilación de la propia Cdk. Como se muestra en la Figura 19.35, la unión de la ciclina mitótica a la Cdk mitótica produce un complejo

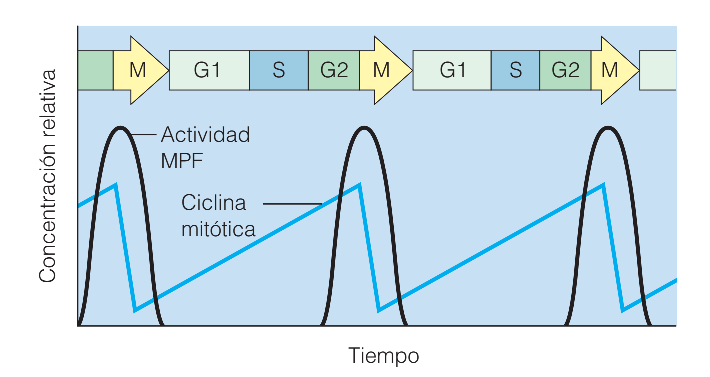


Figura 19.34 Concentración fluctuante de la ciclina mitótica y variaciones en la actividad de MPF, durante el ciclo celular. La concentración celular de la ciclina mitótica aumenta durante la interfase para caer después repentinamente durante la fase M. Los picos de actividad de MPF (estimados en función de su capacidad para estimular la mitosis) coinciden con la concentración de ciclina, aunque el aumento en la actividad de MPF no es significativo hasta que se alcanza un umbral crítico de concentración de ciclina. Se ha encontrado que la MPF activa está formada por la combinación de ciclina mitótica y Cdk mitótica. La Cdk mitótica tiene una concentración constante (no se muestra en el gráfico), porque la cantidad de la proteína Cdk mitótica incrementa con una tasa correspondiente a crecimiento global de la célula.

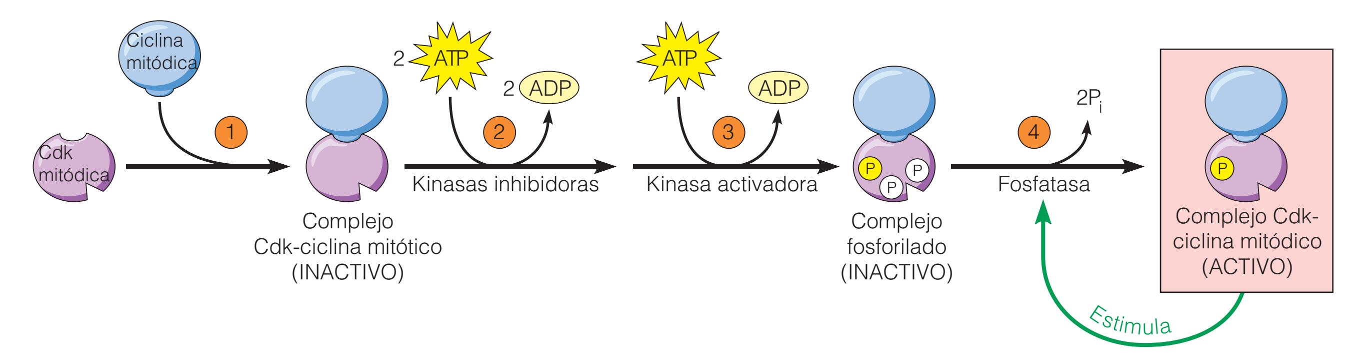


Figura 19.35 **Fosforilación y desfosforilación en la activación del complejo Cdk-ciclina.** El conjunto de reacciones que se muestra aquí para la formación de la Cdk-ciclina mitótica activa, fue elaborado combinando los datos de experimentos realizados en levaduras y en huevos de rana. ① Las proteínas Cdk y la ciclina mitótica forman un complejo inactivo. ② Las quinasas inhibitorias añaden dos grupos fosfato (blanco) al complejo, bloqueando su centro activo. ③ Una quinasa activadora fosforila un tercer sitio del complejo (fosfato amarillo). ④ Los grupos fosfato inhibitorios son eliminados por una fosfatasa, haciendo que el complejo esté fosforilado sólo en un sitio, que es su forma activa. Dicha forma activa de la Cdk-ciclina mitótica estimula a su vez a la fosfatasa para producir nuevas moléculas de Cdk-ciclina activadas. El resultado es un incremento espectacular de la actividad de la Cdk mitótica.

ciclina-Cdk que es inactivo (paso ①). Para desencadenar la mitosis, el complejo requiere la incorporación de un grupo fosfato activador en un determinado aminoácido de la Cdk. Sin embargo, antes de que se produzca esta fosforilación, unas quinasas *inhibitorias* fosforilan la molécula de Cdk en otras dos posiciones, bloqueando el sitio activo (paso ②). Posteriormente, una quinasa activadora añade el grupo fosfato activador, marcado en amarillo en el paso ③. La última etapa de la secuencia de activación es la eliminación de los fosfatos inhibidores, por la actuación de una *fosfatasa* específica (paso ④). Una vez que las fosfatasas han eliminado los fosfatos inhibidores, se establece un bucle de retroalimentación: la Cdk mitótica activada generada por esta reacción estimula a la fosfatasa, y hace que el proceso de activación suceda más rápidamente.

La Cdk-ciclina activa provoca ahora la entrada en mitosis (Figura 19.36). Ya hemos visto que los procesos tempranos de la mitosis comprenden la condensación de los

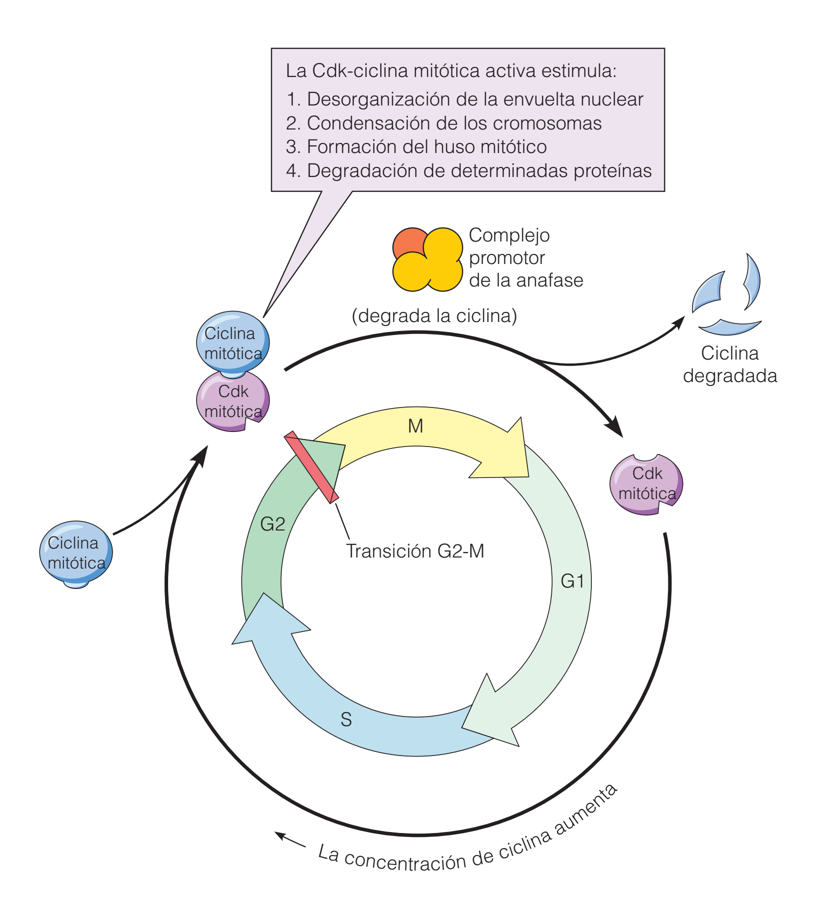


Figura 19.36 **El ciclo de la Cdk mitótica.** Este esquema ilustra la activación y la inactivación de la Cdk mitótica durante el ciclo celular. En las fases G1, S y G2, la Cdk mitótica se fabrica de una manera continua a medida que la célula crece, mientras que la concentración de la ciclina mitótica aumenta gradualmente. La Cdk mitótica y la ciclina forman un complejo activo, cuya actividad proteín quinasa dirige el ciclo celular desde el punto de transición G2-M a la mitosis, estimulando los procesos mitóticos que se enumeran en la figura. El complejo Cdk-ciclina provoca su propia desaparición, mediante la activación de una ruta de degradación de la propia ciclina, permitiendo así la finalización de la mitosis y la entrada en la fase G1 del siguiente ciclo celular.

cromosomas, la formación del huso mitótico y la desorganización de la envuelta nuclear. ¿Cómo desencadena la Cdk-ciclina estos cambios? En el caso de la desorganización de la envuelta nuclear, la Cdk-ciclina fosforila (y estimula a otras quinasas a que fosforilen) a las proteínas de la *lámina nuclear*, que están unidas a la membrana nuclear interna (*véase* Figura 18.31). La fosforilación provoca la depolimerización de las láminas, lo que facilita la ruptura de la lámina nuclear y la desestabilización de la envuelta nuclear. La integridad de la envuelta nuclear se ve perjudicada además por la fosforilación de proteínas asociadas a la envuelta, y las membranas de la envuelta se desgarran. Además, la Cdk-ciclina mitótica fosforila a otras dianas adicionales, también involucradas en procesos mitóticos. Por ejemplo, la fosforilación del complejo multiproteico llamado *condensita*, facilita la condensación de las fibras de cromatina, para formar los cromosomas compactos. Una vez fosforilada por la Cdk-ciclina, la condensina contribuye a la condensación de los cromosomas mediante su unión al DNA, provocando su sobreenrollamiento. En último lugar, se cree que la fosforilación de las proteínas asociadas a los microtúbulos por la Cdk-ciclina mitótica, facilita la formación del huso mitótico.

La Cdk-ciclina mitótica contribuye a la activación del complejo promotor de la anafase

Además de su papel en el inicio de la mitosis, la Cdk-ciclina también desempeña una función importante en etapas posteriores, cuando se toma la decisión de separar las cromátidas hermanas en el comienzo de la anafase. La Cdk-ciclina mitótica participa en este proceso fosforilando y contribuyendo de esta manera a la activación del **complejo promotor de la anafase**, un complejo multiproteico, que controla las fases finales de la mitosis promoviendo la destrucción de determinadas proteínas. El complejo promotor de la anafase es una *ubicuitin ligasa*, un tipo de enzima que marca a proteínas específicas para su degradación, mediante la unión de la pequeña proteína *ubicuitina.* Las proteínas que han sido marcadas con ubiquitina se destruyen después, por un mecanismo que se describirá en el Capítulo 23.

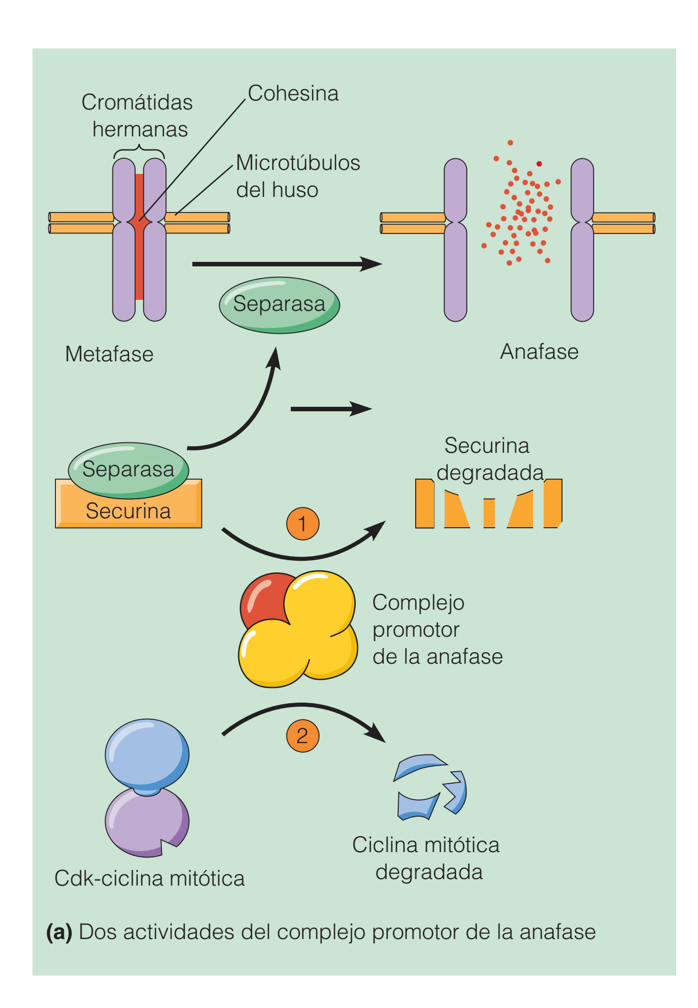
Como se muestra en la Figura 19.37a, el complejo promotor de la anafase inicia la anafase provocando la destrucción de las proteínas adhesivas que mantienen las cromátidas hermanas unidas. Estas proteínas adhesivas, denominadas **cohesinas**, se depositan sobre el DNA cromosómico de nueva síntesis durante la fase S, siguiendo el movimiento de las horquillas de replicación y asegurando que las cromátidas hermanas queden inmediatamente unidas una a otra. Al comienzo de la anafase, las cohesinas que mantienen unidas las cromátidas hermanas se destruyen por un proceso en el que el complejo promotor de la anafase activa una proteasa llamada *separasa*, porque marca al inhibidor de esta enzima, la securina, para que sea destruida. La separasa activa rompe las cohesinas, liberando las cromátidas para que puedan separarse una de otra y comenzar sus movimientos de anafase hacia los polos del huso.

Además de iniciar la anafase haciendo que sean destruidas las cohesinas, el complejo promotor de la anafase también induce unos procesos asociados con el fin de la mitosis marcando a la ciclina mitótica para su destrucción. La pérdida resultante de ciclina mitótica hace a su vez que decaiga la actividad proteín quinasa de la Cdk mitótica. Existen pruebas experimentales que sugieren, que muchos de los cambios relacionados con la salida de la mitosis, como la descondensación de los cromosomas y la reestructuración de la envuelta nuclear, dependen de la degradación de la ciclina y de la consiguiente disminución de la actividad de Cdk. Por ejemplo, se ha demostrado que la adición de una forma no degradable de la ciclina mitótica a los huevos de rana, bloquea la reaparición de la envuelta nuclear y frena la descondensación de los cromosomas, impidiendo de esta manera que finalice la mitosis.

La Cdk-ciclina de G1 regula la progresión a través del punto de restricción, mediante la fosforilación de la proteína Rb

Una vez que hemos examinado el papel que desempeña la Cdk-ciclina en el control de los procesos asociados con la mitosis, veamos brevemente cómo otro tipo de Cdk-ciclina regula la entrada en la fase S. Como se ha mencionado anteriormente, el punto de restricción (Start en las levaduras) es un mecanismo de control situado al final de G1, que determina la entrada de una célula en la fase S, su progreso por el resto del ciclo celular, y su división. Debido a que traspasar el punto de restricción es el paso principal que conduce a una célula al ciclo de división celular, este punto está sujeto al control por varios factores, como son el tamaño celular, la disponibilidad de nutrientes y la presencia de factores de crecimiento, que indiquen la necesidad de la proliferación celular.

Estas señales ejercen sus efectos activando la Cdk-ciclina de G1, cuya actividad proteín quinasa hace que la célula traspase el punto de restricción mediante la fosforilación de varias proteínas diana. Una de las dianas más importantes es la proteína Rb, una molécula que controla la expresión de genes cuyos productos son necesarios para traspasar el punto de restricción y entrar en la fase S. En la Figura 19.38 se recoge el mecanismo molecular a través del cual Rb ejerce su control. Antes de ser fosforilado por la Cdk-ciclina de G1, Rb se une e inhibe al factor de transcripción E2F, una proteína que de otra manera activaría la transcripción de genes que codifican productos requeridos para iniciar la replicación del DNA. Mientras la proteína Rb permanezca unida a E2F, la molécula de E2F es inactiva y estos genes permanecen silenciados, impidiendo que la célula entre en la fase S. Pero cuando se estimula a la célula a dividirse mediante la adición de factores de crecimiento, se activa una



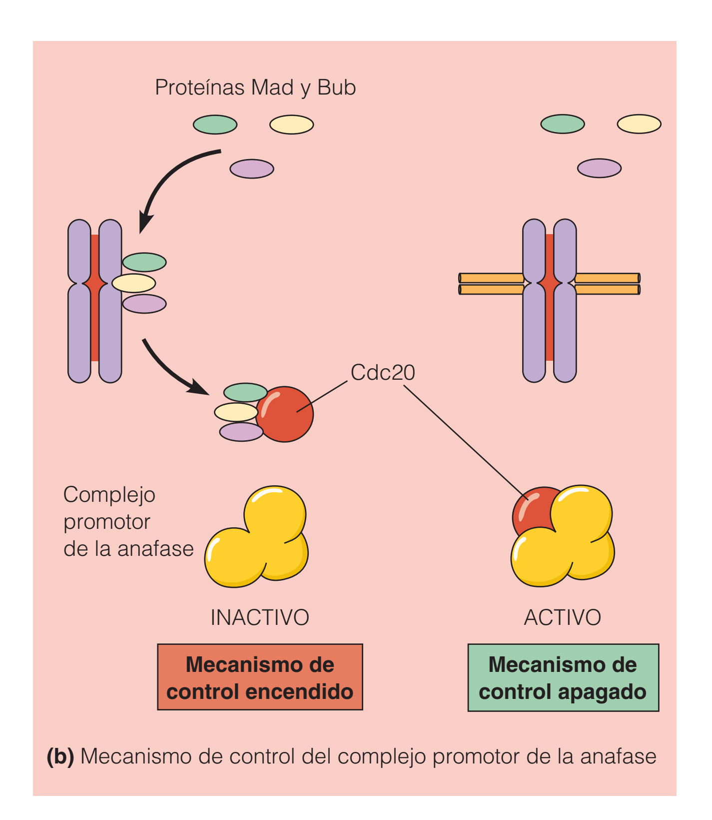


Figura 19.37 El complejo promotor de la anafase y el punto de control del huso. (**a**) El complejo promotor de la anafase controla las etapas finales de la mitosis marcando a ciertas proteínas para su degradación. Dos de éstas son la securina y la ciclina mitótica. La degradación de la securina lleva a la activación de la separasa, una proteasa que desencadena el inicio de la anafase, rompiendo las cohesinas que mantienen unidas las cromátidas hermanas. La degradación de la ciclina mitótica conlleva la pérdida de actividad de la Cdk mitótica, que a su vez provoca la descondensación de los cromosomas y la reestructuración de la envuelta nuclear. (**b**) El punto de control del huso, asegura que la anafase no comience hasta que los cromosomas estén unidos al propio huso. Las cromátidas hermanas, que todavía no se encuentran unidas al huso mitótico (*izquierda*), mandan una señal de «espera» que impide un movimiento prematuro de los cromosomas hacia los polos. La señal de «espera» involucra a las proteínas Mad y Bub, que forman un complejo en el cinetocoro, que inhibe a la proteína Cdc20, que se necesita para activar el complejo promotor de la anafase. Después de que los cromosomas se hayan unido al huso (*derecha*), esta señal de «espera» cesa, y el complejo promotor de la anafase se vuelve activo.

ruta que produce y activa a las Cdk-ciclinas de G1 que catalizan la fosforilación de Rb. La fosforilación de Rb bloquea la capacidad de Rb de unirse a E2F, quedando E2F libre para activar la transcripción de los genes cuyos productos son necesarios para entrar en la fase S.

Dado que la proteína Rb regula un proceso tan importante, es decir, la decisión de traspasar el punto de restricción y seguir con el ciclo de división celular, no es sorprendente descubrir que los defectos en Rb pueden tener consecuencias desastrosas. Por ejemplo, veremos en el Capítulo 24 cómo dichos defectos pueden producir formas de cáncer hereditarias o inducidas por agentes ambientales.

Los puntos de control supervisan las interacciones de los cromosomas con el huso, la finalización de la replicación del DNA y posibles daños en el DNA

Obviamente, sería problemático para una célula pasar de una fase del ciclo a la siguiente, sin haber completado adecuadamente la fase previa. Por ejemplo, si los cromosomas comienzan a desplazarse hacia los polos del huso antes de haberse unido adecuadamente a él, las células hijas podrían recibir copias extra de algunos cromosomas y ninguna copia de otros. De igual manera, sería potencialmente peligroso para una célula comenzar la mitosis antes de que todo su DNA cromosómico se hubiera replicado. Para minimizar la posibilidad de dichos errores, la célula utiliza una serie de sistemas o **puntos de control**, que evalúan las condiciones internas de la célula y detienen transitoriamente el ciclo celular, si dichas condiciones no son las adecuadas para la progresión.

La ruta de control que impide que comiencen los movimientos de los cromosomas en la anafase antes de que estén unidos todos al huso mitótico, se denomina **punto de control del huso**. Se basa en que los cromosomas cuyos ci-

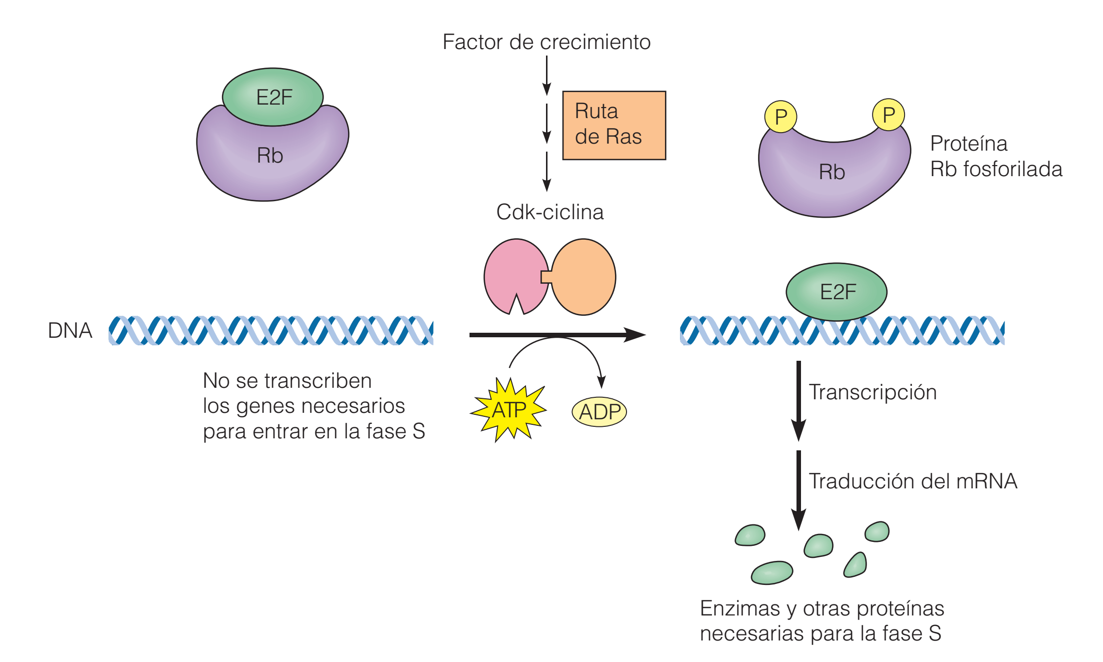


Figura 19.38 **Función de la proteína Rb en el control del ciclo celular.** En su estado normal, Rb se encuentra desfosforilada, y se une al factor de transcripción E2F. Esta unión impide que E2F active la transcripción de genes que codifican proteínas necesarias para la replicación del DNA, que constituyen un requisito previo al paso de la célula a través del punto de restricción y la entrada en la fase S. En aquellas células que han sido estimuladas con factores de crecimiento, se activa la ruta de Ras (Figura 19.41), lo que conlleva a la producción y activación de un complejo Cdk-ciclina que cataliza la fosforilación de Rb. Rb fosforilado ya no puede unirse a E2F, permitiendo así que E2F active la transcripción génica y se inicie la fase S. Durante la fase M subsiguiente (no mostrada), la proteína Rb se desfosforila y puede volver a inhibir a E2F.

netocoros no estén unidos a los microtúbulos del huso, producen una señal de «espera» que inhibe al complejo promotor de la anafase. Mientras el complejo promotor de la anafase esté inhibido, no se destruyen las cohesinas, que mantienen unidas las cromátidas hermanas. La señal de «espera» responsable de inhibir el complejo promotor de la anafase, la transmiten proteínas que forman parte de la familia de *Mad* y *Bub*. Las proteínas Mad y Bub se acumulan en los cinetocoros de los cromosomas sin unir, donde forman un complejo multiproteico que inhibe el complejo promotor de la anafase, bloqueando la acción de la proteína *Cdc20* (Figura 19.37b). Una vez que todos los cromosomas se hayan unido al huso, las proteínas Mad y Bub no forman ya el complejo inhibitorio y el complejo promotor de la anafase es libre para iniciar la anafase.

Un segundo mecanismo de control, denominado **sistema de control de la replicación del DNA**, controla el estado de la replicación del mismo, para asegurar que su síntesis se completa, antes de permitir que la célula salga de G2 y comience la mitosis. Se ha demostrado la existencia de este mecanismo de control mediante el tratamiento de células con inhibidores que impiden que finalice la replicación del DNA. En estas condiciones, la etapa de la desfosforilación final implicada en la activación de la Cdk-ciclina mitótica (paso (4) de la Figura 19.35) se bloquea, por medio de una serie de eventos provocados por proteínas relacionadas con la replicación del DNA. La pérdida consiguiente de la actividad de la Cdk-ciclina, detiene el ciclo celular al final de G2, hasta que se completa la replicación del DNA.

Un tercer tipo de mecanismo de control está implicado en impedir que las células con el DNA dañado progresen en el ciclo celular a menos que se repare primero el daño. En este caso, existen múltiples **puntos de control del DNA dañado** que revisan la existencia de alteraciones y que detienen el ciclo celular en las fases G1 tardía, S o G2 tardía, gracias a la inhibición de complejos Cdk-ciclina diferentes. Una proteína denominada p53, denominada a menudo «el guardián del genoma», desempeña un papel capital en estas rutas de control. Como muestra la Figura 19.39, cuando las células se encuentran con agentes que producen un daño de gran alcance en el DNA, éste provoca la activación de una enzima denominada *proteín quinasa ATM*, que a su vez cataliza la fosforilación de p53 (y de muchas otras proteínas diana). La fosoforilación de p53 impide su interacción con *Mdm2*, una proteína que de otra manera marcaría a p53 para su destrucción, añadiendo ubicuitina (de la misma manera que el complejo promotor de la anafase marca a proteínas para su degradación provocando su unión a ubiquitina). La fosforilación de p53, mediada por ATM, la protege de su degradación, permitiendo que aumente p53 en presencia de DNA dañado.

La acumulación de p53 a su vez activa dos procesos: la *detención del ciclo celular* y la *muerte celular*. Ambas respuestas se basan en la capacidad de p53 de unirse al DNA y

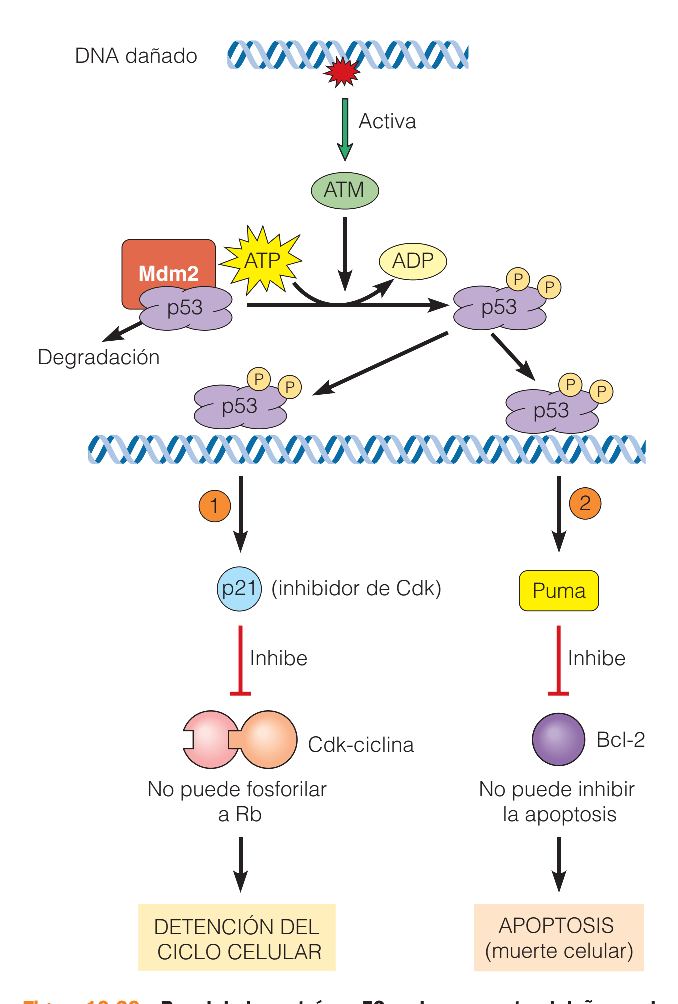


Figura 19.39 Papel de la proteína p53 en la respuesta al daño en el DNA. El DNA dañado activa a la proteín quinasa ATM, lo que produce la fosforilación de la proteína p53. La fosforilación estabiliza a p53, bloqueando su interacción con Mdm2, una proteína que de otra manera marcaría a p53 para su degradación (el mecanismo de degradación no se muestra, pero implica la unión de p53, catalizada por Mdm2, a la ubiquitina, que marca las moléculas para su degradación en la principal máquina de destrucción de proteínas de la célula, el proteosoma). Cuando se bloquea la interacción de p53 y Mdm2 por la fosforilación de p53, la proteína p53 fosforilada se acumula y desencadena dos procesos: ① La proteína p53 se une al DNA y funciona como un factor de transcripción del gen que codifica para la proteína p21, un inhibidor de Cdk. La inhibición resultante de la Cdk-ciclina impide la fosforilación de la proteína Rb, haciendo que el ciclo celular quede detenido en este punto. ② Cuando no puede ser reparado el daño en el DNA, p53 activa a otros genes que codifican un grupo de proteínas implicadas en promover la muerte celular por apoptosis. Una proteína clave es Puma, que promueve la apoptosis, uniéndose y bloqueando la acción de Bcl-2, uno de los inhibidores de apoptosis.

de actuar como un factor de transcripción que estimula la transcripción de genes específicos. Uno de los genes claves activados por p53 es el gen que codifica a p21, una proteína que detiene la progresión del ciclo celular en múltiples puntos inhibiendo la actividad de varias Cdk-ciclinas diferentes. p53 fosforilada también estimula la producción de enzimas implicadas en la reparación del DNA. Pero si el daño no puede ser reparado con éxito, p53 activa entonces un grupo de genes que codifica para proteínas implicadas en desencadenar la muerte celular por apoptosis. Una proteína clave en esta ruta, llamada **Puma** («modulador de la apoptosis regulado a la alta por p53»), promueve la apoptosis uniéndose e inactivando a un inhibidor común de la apoptosis, conocido como *Bcl-2*.

La capacidad de p53 para provocar la detención del ciclo y la muerte celular, le capacita para funcionar como un semáforo molecular, que impide la proliferación de células con el DNA dañado, y que pase el daño a las células hijas. La importancia de esta función se subrayará en el Capítulo 24, donde describiremos cómo los defectos en la ruta de p53 contribuyen al desarrollo del cáncer.

Juntando las piezas: la máquina de regulación del ciclo celular

La Figura 19.40 resume de manera simplificada los principales aspectos de la «máquina» molecular que regula el ciclo celular eucariota. El funcionamiento de esta máquina se puede describir en términos de dos mecanismos acoplados. Uno de ellos es un reloj autónomo cíclico, que se repite una y otra vez. La base molecular de este reloj es la síntesis y degradación rítmica de ciclinas. Estas ciclinas se unen a su vez a las moléculas de Cdk, formando los complejos Cdk-ciclina, que provocan el paso de la célula a través de los puntos de transición del ciclo celular. El segundo mecanismo ajusta el reloj según las necesidades, mediante la retroalimentación desde los ambientes interno y externo de la célula. Este mecanismo hace uso de proteínas adicionales que, directa o indirectamente, influyen en la actividad de las Cdks y las ciclinas. Muchas de estas proteínas adicionales son proteín quinasas o fosfatasas. Es ésta la parte del ciclo celular que transmite la información sobre del estado del metabolismo celular, incluyendo posibles daños en el DNA y defectos en la replicación, y de las condiciones externas a la célula, determinando así, si una célula debe dividirse o no. Como veremos a continuación, las moléculas de señalización que promueven o que inhiben el crecimiento, y que vienen del exterior celular, son componentes importantes de este mecanismo regulador.

Factores de crecimiento y proliferación celular

Los organismos unicelulares simples, como las bacterias o las levaduras, viven bajo unas condiciones en las que la presencia de suficientes nutrientes en el ambiente es el factor principal que determina si una célula crece o se divide. En los organismos pluricelulares, la situación es casi la contraria. Las células viven rodeadas de fluidos extracelulares ricos en nutrientes, pero el organismo sería destruido rápidamente si todas las células creciesen y se dividiesen

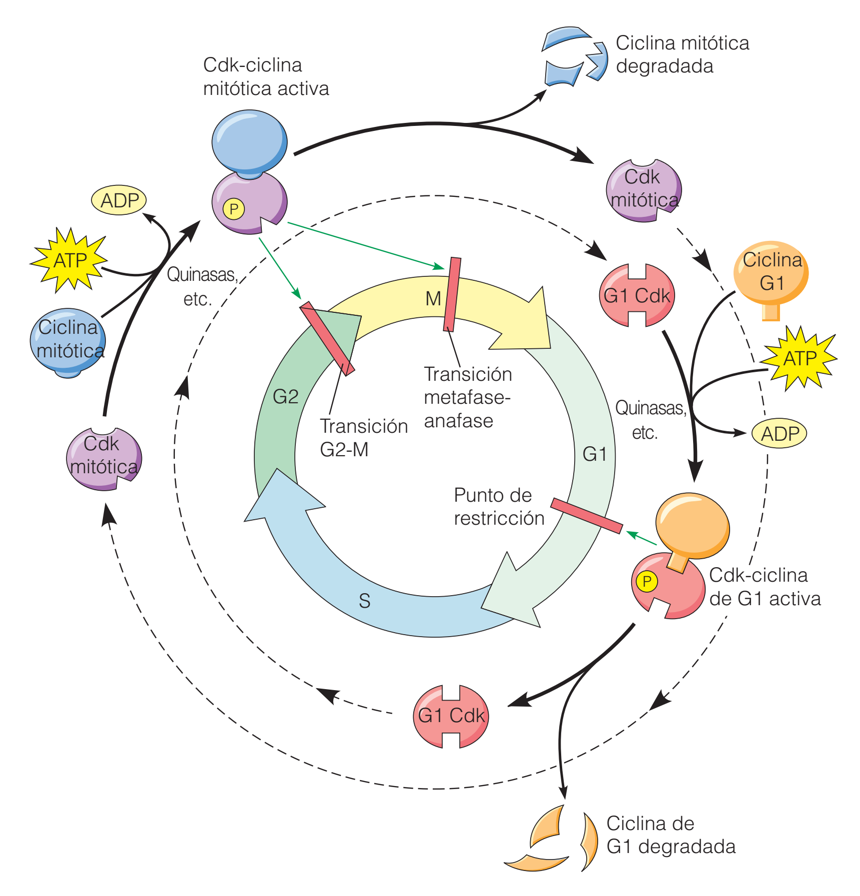


Figura 19.40 Modelo general de la regulación del ciclo celular. Según este modelo, el paso a través de los tres puntos de transición principales en el ciclo celular viene determinado por complejos proteicos compuestos por ciclina y Cdk, cuya actividad en la adición de grupos fosfatos a otras proteínas induce la progresión por el ciclo. La Cdk-ciclina de G1 actúa en el punto de transición a través de la fosforilación de la proteína Rb. La Cdk-ciclina mitótica actúa en la transición G2-M catalizando la fosforilación de proteínas implicadas en la condensación de los cromosomas, la desorganización de la envuelta nuclear y la formación del huso. La misma Cdk-ciclina actúa también en la transición metafase-anafase, catalizando la fosforilación de los componentes del complejo promotor de la anafase, que a su vez provocan la separación de los cromosomas y la destrucción de la ciclina mitótica. Las rutas de control que monitorizan el daño en el DNA, la replicación del DNA, y la unión de los cromosomas al huso, pueden enviar señales que detienen el ciclo celular en uno o más de estos puntos clave de transición.

continuamente, por el simple hecho de tener acceso a los nutrientes adecuados. El cáncer es una condición potencialmente letal que nos recuerda lo que puede suceder, cuando la proliferación celular tiene lugar de forma no coordinada con las necesidades del organismo completo. Para hacer frente a este problema, los organismos utilizan proteínas extracelulares de señalización denominadas **factores de crecimiento**, que controlan la tasa de crecimiento y división celular (*véase* Tabla 14.2). La mayor parte de los factores de crecimiento son *mitógenos*, lo que significa que inducen a la célula a entrar en la fase S del ciclo celular, a la que le sigue la fase G2 y la mitosis.

Los factores de crecimiento estimuladores activan la ruta de Ras

Si se cultivan células de mamífero en un medio con nutrientes y vitaminas, pero sin factores de crecimiento, normalmente las células se detienen en G1 pese a la presencia de los nutrientes adecuados. Se puede provocar el crecimiento y la división añadiendo cantidades pequeñas de suero sanguíneo, que contiene varios factores estimuladores del crecimiento. Entre éstos se encuentra el **factor de crecimiento derivado de plaquetas** (**PDGF**), una proteína producida por las plaquetas, que estimula la proliferación de las células del tejido conectivo y las células del músculo liso. Otro factor de crecimiento importante, denominado **factor de crecimiento epidérmico** (**EGF**), está ampliamente distribuido en muchos tejidos y fluidos corporales. El EGF fue aislado por primera vez de las glándulas salivales de ratón por Stanley Cohen, que recibió el Premio Nobel en 1987 por sus estudios pioneros sobre los factores de crecimiento. Algunos factores de crecimiento, como el EGF, estimulan el crecimiento de una gran variedad de tipos celulares, mientras que otros actúan de una manera más selectiva sobre células diana particulares. Los factores de crecimiento estimulan el crecimiento tisular durante el desarrollo embrio-

nario y en la cicatrización de las heridas y la regeneración tisular en el adulto. Por ejemplo, la liberación del factor de crecimiento PDGF por parte de las plaquetas contribuye a la estimulación del crecimiento tisular necesario para que se cierren las heridas.

Los factores de crecimiento, como el PDGF y el EGF, actúan uniéndose a receptores de la membrana plasmática de las células diana. Existen diferentes tipos de receptores en función del tipo celular, y por lo tanto, los distintos tipos celulares difieren en los factores de crecimiento a los que responden. En el Capítulo 14, vimos que los receptores de factores de crecimiento presentan actividad tirosín quinasa. La unión de un factor de crecimiento a su receptor estimula dicha actividad tirosín quinasa, fosforilando los residuos de tirosina localizados en la región intracelular del receptor. La fosforilación de las tirosinas desencadena a su vez una compleja cascada de reacciones, que culmina con el paso de la célula a través del punto de restricción y su entrada en la fase S. La *ruta de Ras*, que fue presentada en el Capítulo 14, desempeña un papel central en estos eventos, como demuestran los estudios con células que se habían detenido porque no había factores de crecimiento disponibles. Cuando se inyectan intracelularmente formas mutantes hiperactivas de la proteína Ras, las células pasan a la fase S y comienzan a dividirse, aunque el factor de crecimiento no esté presente. Por otro lado, la inyección de las células con anticuerpos que inactivan la proteína Ras, impide el paso a la fase S y posterior división, pese a que se persista la estimulación con factores de crecimiento.

Como se muestra en la Figura 19.41, el mecanismo mediante el cual la ruta de Ras induce a las células a franquear el punto de restricción y entrar en la fase S, implica seis pasos. ① El factor de crecimiento estimulador se une en primer lugar a su receptor de la membrana plasmática. ② Di-

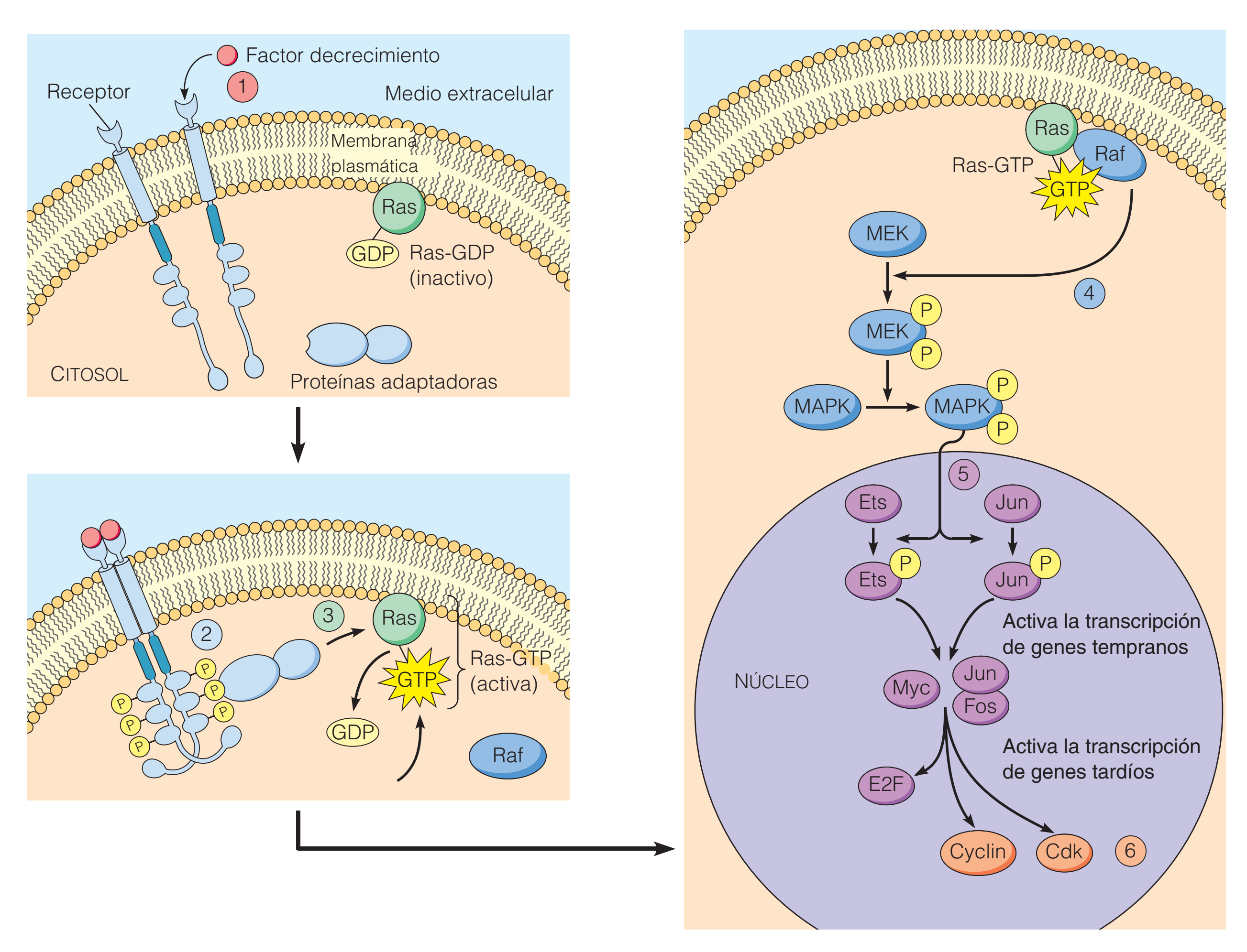


Figura 19.41 **Señalización de los factores de crecimiento a través de la ruta de Ras.** Los científicos han reunido muchas de las piezas que componen la compleja cadena de eventos moleculares que se ponen en marcha tras la unión de un factor de crecimiento a su receptor de membrana, y que desembocan en el crecimiento y la división celular. La proteína Ras es un intermediario clave en esta ruta, que está compuesta por seis pasos principales: ① Unión del factor de crecimiento a su receptor; ② fosforilación del receptor; ③ activación de Ras; ④ activación de una cascada de proteín quinasas citoplasmáticas (Raf, MEK y MAPK); ⑤ activación o producción de factores de transcripción nucleares (Ets, Jun, Fos, Myc, E2F); y ⑥ síntesis de moléculas de ciclina y Cdk. Los complejos Cdk-ciclina resultantes catalizan la fosforilación de Rb y provocan el paso de G1 a la fase S (MAPK = Map quinasas).

cha unión provoca la agrupación de dos receptores, formándose un dímero en el que la actividad tirosín quinasa de cada receptor, fosforila los residuos de tirosina del otro receptor. ③ Las tirosinas fosforiladas sirven como sitios de unión de una serie de proteínas adaptadoras, que a su vez activan a la proteína G de membrana, Ras. Como sucede habitualmente con las proteínas G, la activación de la proteína Ras está asociada a la unión de GTP y la liberación de GDP.

④ Ras activada desencadena una cascada de fosforilaciones de proteínas, que comienza con la fosforilación de una proteín quinasa conocida como *Raf.* Raf activada fosforila residuos de serina y de treonina en una familia de proteín quinasas conocida como *MAP quinasas (quinasas activadas por mitógenos; MAPK).* ⑤ las MAP quinasas activadas entran en el núcleo y fosforilan varios **factores de transcripción**, que son proteínas que activan la transcripción de genes específicos. Entre las proteínas activadas por este mecanismo de fosforilación encontramos a Jun (uno de los componentes del factor de transcripción AP-1) y proteínas que son miembros de la familia de los factores de transcripción *Ets.* Estos factores de transcripción activados promueven la transcripción de los «genes tempranos» que codifican otros factores de transcripción de «genes tardíos». Uno de estos últimos genes codifica el factor de transcripción E2F, cuyo papel en el control de la entrada en la fase S, fue descrito anteriormente en este capítulo. ⑥ También están incluidos en este grupo de genes tardíos, varios genes que codifican tanto Cdks como ciclinas, y cuya producción lleva a la formación de complejos Cdk-ciclina que fosforilan a Rb y provocan el paso a la fase S desde G1.

En resumen, la ruta de Ras es una cascada de señalización de múltiples pasos en los que la unión de un factor de crecimiento a un receptor de la superficie celular, hace que en último término se pase el punto de restricción y por lo tanto a la fase S, comenzando el camino para la división celular. Se ha resaltado la importancia de esta ruta en el control de la proliferación celular tras el descubrimiento de que las células cancerosas tienen frecuentemente mutaciones que afectan a la ruta de Ras. Por ejemplo, las proteínas mutantes de Ras que estimulan la proliferación celular en ausencia de factores de crecimiento, aparecen frecuentemente en los cánceres de páncreas, colon, pulmón y vesícula biliar y están presentes en el 25-30% del total de los cánceres humanos. En el Capítulo 24, se describirá con más detalle el papel en el desarrollo del cáncer desempeñado por las mutaciones en la ruta de Ras.

Los factores de crecimiento estimuladores pueden activar también la ruta de la PI3K-Akt

Cuando un factor de crecimiento se une a un receptor que provoca la activación de la ruta de Ras, el receptor activado también puede activar simultáneamente a otras rutas. Por ejemplo, la ruta de la PI3K-Akt, comienza con la activación, mediada por receptor, de la fosfatidilinositol 3-quinasa (abreviada como PI3-quinasa o PI3K). Como se muestra en la Figura 19.42, la PI3K se activa cuando se une a las tirosinas fosforiladas que se encuentran en los receptores que han sido estimulados por la unión de un factor de crecimiento (recordemos de la Figura 19.41, que la activación de la ruta de Ras implicaba un mecanismo similar). La PI3K cataliza posteriormente la adición de un grupo fosfato al lípido de membrana denominado PIP_2 (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato), que pasa de PIP_2 a PIP_3 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato). PIP_3 a su vez recluta proteín quinasas a la superficie interna de la membrana plasmática, produciendo la fosforilación y la activación de una proteín quinasa denominada **Akt.** Gracias a su capacidad de fosforilar varias proteínas diana clave, Akt impide la apoptosis y el bloqueo del ciclo celular. El efecto neto de la ruta de señalización de PI3K-Akt es, por lo tanto, promover la supervivencia y la proliferación celular.

Como en el caso de la ruta de Ras, las mutaciones que alteran el comportamiento normal de la ruta PI3K-Akt están asociadas a muchos cánceres. En algunos casos, estas mutaciones producen una actividad excesiva de la proteína Akt que conlleva a un incremento en la supervivencia y la proliferación celular. En otros casos, la hiperactividad de la ruta de PI3K-Akt está provocada por mutaciones que inhabilitan a proteínas que normalmente inhiben esta ruta. Una de estas proteínas es **PTEN,** una fosfatasa que elimina un grupo fosfato de PIP_3 y previene de esta manera la activación de Akt (Figura 19.42). Cuando las mutaciones alteran PTEN, la célula no puede degradar eficazmente PIP_3, que empieza a acumularse. Esta acumulación de PIP_3 activa a Akt de una forma descontrolada, incluso en ausencia de factores de crecimiento, lo que conlleva a una proliferación y supervivencia aumentada. Las mutaciones que reducen la actividad de PTEN se encuentran en un 50% de los cánceres de próstata, un 35% de los cánceres de útero, y en una proporción variable en los cánceres de ovario, mama, hígado, pulmón, riñón, tiroides y linfoides.

Los factores de crecimiento inhibidores actúan a través de inhibidores de Cdks

Aunque normalmente se piensa en los factores de crecimiento como moléculas estimuladoras del crecimiento, la función de algunos de ellos es, de hecho, inhibir la proliferación celular. Un ejemplo es el **factor β transformante del crecimiento (TGFβ)**, una proteína que puede tener propiedades estimulantes del crecimiento o inhibidoras del crecimiento, dependiendo del tipo de célula diana. Los efectos antiproliferativos del TGFβ incluyen el antagonismo de los efectos estimuladores del crecimiento de otros factores, como el EGF y el PDGF.

Cuando funciona como un inhibidor del crecimiento, la unión de TGFβ a su receptor de la membrana celular, desencadena una serie de eventos en los que el receptor catali-

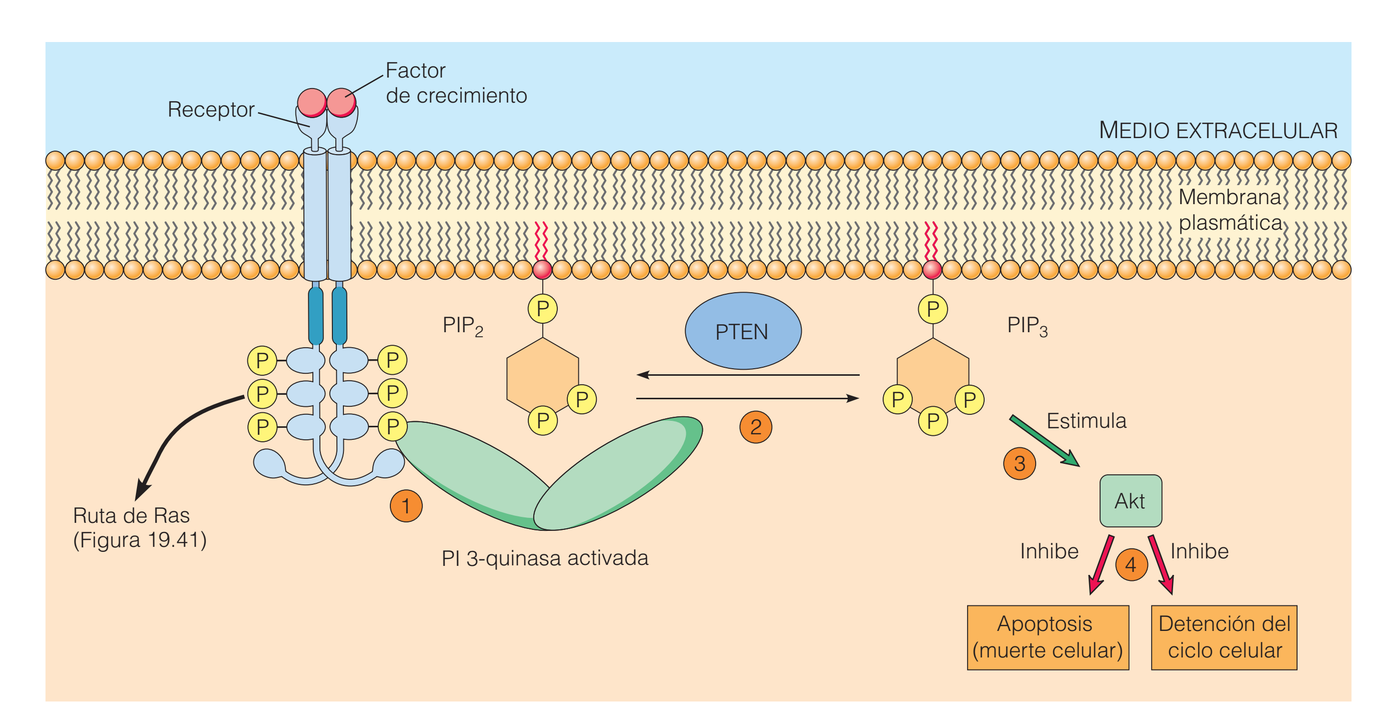


Figura 19.42 La ruta de señalización de PI3K-Akt. Los factores de crecimiento que se unen a los receptores tirosin quinasas, activan varias rutas, además de la ruta de Ras ilustrada en la Figura 19.41. Una de estas rutas comienza con ① la activación de PI3-quinasa a través de tirosinas fosforiladas situadas en los receptores, que han sido estimulados por un factor de crecimiento. ② La PI3-quinasa añade un grupo fosfato al lípido de membrana PIP_2, convirtiéndolo en PIP_3. ③ PIP_3 recluta proteín quinasas a la membrana plasmática, produciendo la fosforilación y la activación de una proteín quinasa llamada Akt. ④ Gracias a su capacidad de catalizar la fosforilación de varias proteínas diana clave, Akt impide la apoptosis e inhibe el bloqueo del ciclo celular. De esta manera, el efecto neto de la señalización por PI3K-Akt es la proliferación y la supervivencia celular. La ruta de señalización de PI3K-Akt es inhibida por PTEN, una enzima que invierte el paso ② catalizando la conversión de PIP_3 en PIP_2.

za la fosforilación de las proteínas *Smad*, que se desplazan al núcleo y regulan la expresión génica (*véase* Figura 14.21). Una vez dentro del núcleo, las proteínas Smads activan la expresión de los genes que codifican proteínas que inhiben la proliferación celular. Dos genes clave producen las proteínas conocidas como *p15* y *p21*, que son **inhibidores de Cdk** y suprimen la actividad de los complejos Cdk-ciclina, bloqueando así la progresión del ciclo celular. (La proteína p21 ha sido mencionada anteriormente, cuando analizamos el mecanismo de detención del ciclo celular mediado por p53.)

Las señales inhibidoras del crecimiento que actúan en la célula produciendo inhibidores de Cdk, protegen a los tejidos normales de un número excesivo de divisiones que darían lugar a muchas más células de las necesarias. En el Capítulo 24 veremos cómo los defectos en dichas rutas pueden llevar a una proliferación celular descontrolada y al desarrollo del cáncer.

Perspectiva

El ciclo celular eucariota está dividido en cuatro fases principales, denominadas G1, S, G2 y M. El DNA cromosómico se replica durante la fase S, y la división celular (mitosis y citocinesis) tiene lugar durante la fase M. La interfase, representada por las fases G1, S y G2, es un periodo de crecimiento y metabolismo celular que normalmente ocupa el 95% del tiempo total del ciclo. Las células de mamífero en cultivo se dividen normalmente una vez cada 18-24 horas, pero las células de los organismos pluricelulares difieren enormemente en su tiempo de generación, desde la continuidad y la rápidez con las que se dividen las células madre, hasta las células diferenciadas que no se dividen normalmente.

El DNA se replica por un mecanismo semiconservativo en el que las dos hebras de la doble hélice se desenrollan y cada una de ellas sirve como molde para la síntesis de una cadena complementaria. La replicación del cromosoma bacteriano se inicia en un único punto y se mueve en ambas direcciones alrededor de la molécula circular del DNA. En contraste, los eucariotas inician la replicación del DNA en múltiples replicones, procediendo bidireccionalmente en cada replicón. La sín-

tesis de DNA está catalizada por las DNA polimerasas, que incorporan nucleótidos a las cadenas de DNA en dirección $5' \rightarrow 3'$. La síntesis de DNA es continua en la cadena conductora, pero discontinua en la cadena retrasada, que genera fragmentos de Okazaki que se juntan posteriormente mediante una DNA ligasa. La replicación el DNA se inicia gracias a una enzima denominada primasa, que sintetiza pequeños cebadores de RNA que posteriormente se eliminan y son reemplazados por DNA. Durante la replicación del DNA, la doble hélice se desenrolla por la acción de helicasas, topoisomerasas y proteínas de unión al DNA de cadena sencilla. A medida que progresa la replicación, un mecanismo corrector de errores basado en la actividad exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ de la DNA polimerasa, permite eliminar y reemplazar las bases apareadas incorrectamente.

En eucariotas, el problema de replicar los extremos del DNA lineal cromosómico se soluciona con la telomerasa, una enzima que usa su RNA como molde para crear pequeñas secuencias repetidas de DNA en los extremos de cada DNA cromosómico. Un mecanismo conocido como autorización, asegura que en los eucariotas, las moléculas de DNA se replican una sola vez antes de la mitosis.

El daño en el DNA surge tanto espontáneamente como por la acción de agentes químicos y radiaciones causantes de mutaciones. Ciertos tipos de daño en el DNA son tolerados por la DNA polimerasa, que lleva a cabo una síntesis trans-lesión de nuevo DNA en las regiones donde está dañado. Alternativamente, las regiones dañadas pueden ser reparadas por nucleasas que eliminan los tramos defectuosos, para que a continuación, la DNA polimerasa reemplace los nucleótidos que faltan. Las reacciones de reparación por escisión se utilizan para reparar mutaciones que implican a bases anormales, mientras que la reparación de los apareamientos erróneos elimina y reemplaza los nucleótidos mal apareados, que hayan escapado a los mecanismos correctores. Por último, las roturas de doble cadena se reparan por unión de extremos no homólogos o por recombinación homóloga.

La mitosis, el proceso que distribuye los dos grupos de cromosomas duplicados en dos núcleos hijos, está formada por cinco fases: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. Durante la profase, los cromosomas replicados se condensan en cromátidas hermanas que permanecen unidas. Mientras tanto, los dos centrosomas de la célula se separan e inician la polimerización de los microtúbulos (MTs) del huso mitótico. En la prometafase la envuelta nuclear se fragmenta y los cromosomas quedan unidos a los MTs del cinetocoro y se mueven hacia el ecuador del huso. En la metafase, los cromosomas se alinean en la placa metafásica. La anafase comienza con la separación de las cromátidas hermanas y continúa con el movimiento, ahora como cromosomas hijos, hacia los polos del huso. Durante este proceso, los MTs del cinetocoro se encogen, los MTs polares se alargan, y la célula comienza a alargarse. En la telofase, los cromosomas separados se descondensan y se forma de nuevo la envuelta nuclear alrededor de cada núcleo hijo.

Hay tres grupos de proteínas motoras implicadas en el movimiento de los cromosomas que tienen lugar durante la mitosis. Las proteínas motoras situadas en el cinetocoro y en los polos de huso, provocan el movimiento de los cromosomas hacia los polos del huso, que viene acompañado por la despolimerización de los MTs en sus extremos *menos*. Al mismo tiempo, las proteínas motoras que entrecruzan los MTs polares empujan a microtúbulos adyacentes en direcciones opuestas, separando de esta manera los polos del huso entre sí. Por último, un tercer grupo de proteínas motoras tiran de los MTs del áster hacia la membrana plasmática en los polos de la célula, alejando los polos del huso uno de otro.

La citocinesis normalmente comienza antes de que la mitosis se complete. En las células animales, los filamentos de actina forman el surco de segmentación que produce un estrechamiento en la línea media de la célula y que finalmente separa el citoplasma en las dos células hijas. En las células vegetales, se forma una pared celular en la mitad de la célula parental.

La progresión en el ciclo celular eucariota está regulada por quinasas dependientes de ciclina (Cdks), que se unen a ciclinas, para formar complejos Cdk-ciclina. En el punto de restricción (Start en levaduras), un complejo Cdk-ciclina de G1 cataliza la fosforilación de la proteína Rb, que determina el paso a la fase S. En la transición G2-M, una Cdk-ciclina mitótica provoca la entrada en mitosis catalizando la fosforilación de varias proteínas, lo que provoca la desorganización de la envuelta nuclear, la condensación de los cromosomas y la formación del huso. Y en la transición metafase-anafase, la Cdk-ciclina mitótica contribuye a la activación del complejo promotor de la anafase, que activa una ruta de degradación de proteínas, que culmina con la separación de las cromátidas. Esta ruta de degradación de proteínas también afecta a la Cdk-ciclina, lo que conlleva a su inactivación, con el resultado de que se desencadena procesos relacionados con la salida de la mitosis, que incluyen la descondensación de la cromatina y la reestructuración de la envuelta nuclear.

La célula utiliza una serie de mecanismos de control para monitorizar las condiciones internas y detener el ciclo temporalmente si éstas no son las apropiadas. Los mecanismos de control de la replicación del DNA evalúan el estado de la replicación, para comprobar que la síntesis de DNA esté completada antes de permitir que la célula salga de G2 y comience la mitosis. La proteína p53 desempeña un papel central en una serie de mecanismos de control del daño en el DNA, que detienen el ciclo celular en varios puntos, si se detectan alteraciones. Finalmente, el complejo promotor de la anafase participa en el mecanismo de control del huso, que impide que se inicien los movimientos cromosómicos de la anafase antes de que los cromosomas estén correctamente unidos al huso.

Las células de los organismos pluricelulares no proliferan normalmente a no ser que sean estimuladas por un factor de crecimiento apropiado. Habitualmente, la unión de un factor de crecimiento a su receptor de membrana, produce la activación de la ruta de Ras, una cascada de reacciones compleja que culmina con el paso a través del punto de restricción y la entrada en la fase S. Los receptores de los factores de crecimiento activados pueden activar también la ruta de la PI 3K-Akt, que promueve la supervivencia y la proliferación celular a través de la fosforilación, y por tanto de la activación, de proteínas diana que inhiben la detención del ciclo celular. En algunos casos, los factores de crecimiento inhiben (en vez de estimular) la proliferación celular activando la producción de inhibidores de Cdk.

Problemas

Los problemas de mayor dificultad están marcados con un •.

19.1 Fases del ciclo celular. Indique si las siguientes afirmaciones son ciertas para la fase G1 del ciclo celular, para la fase S, la fase G2, o la fase M. Una misma afirmación puede ser cierta para una, todas o ninguna de las fases.

(a) La cantidad de DNA nuclear en la célula se duplica.

(b) La envuelta nuclear se fragmenta.

(c) Las cromátidas hermanas se separan una de otra.

(d) Las células que no volverán a dividirse de nuevo, suelen quedarse detenidas en esta fase.

(e) Se forma la pared celular primaria de un vegetal.

(f) Los cromosomas se presentan como cromatina extendida y difusa.

(g) Esta fase forma parte de la interfase.

(h) La ciclina mitótica se encuentra en sus niveles más bajos.

(i) Una proteína Cdk está presente en la célula.

(j) Se ha identificado en esta fase un mecanismo de control del ciclo celular.

19.2 El índice mitótico y el ciclo celular. El índice mitótico es una medida de la de actividad mitótica en una población celular. Se calcula como el porcentaje de células en mitosis en un momento determinado. Asumamos que después de examinar una muestra con 1.000 células, se encuentra que 30 están en profase, 20 en prometafase, 20 en metafase, 10 en anafase, 20 en telofase y 900 en interfase. De aquellas que se encuentran en interfase, se estima (mediante la tinción de las células con un marcador específico del DNA) que 400 tienen una cantidad X de DNA, 200 tienen $2X$, y 300 una cantidad más o menos intermedia entre las dos anteriores. El análisis autorradiográfico indica que la fase G2 dura 4 horas.

(a) ¿Cuál es el índice mitótico de esta población de células?

(b) Especifique la proporción del ciclo celular que se ha destinado en cada una de las fases siguientes: profase, prometafase, metafase, anafase, telofase, G1, S, G2.

(c) ¿Cuál es la duración total del ciclo celular?

(d) ¿Cuánto tiempo (en horas) se emplea en cada fase de la parte b?

(e) Para medir la fase G2, se añadió timidina radiactiva (un precursor del DNA) al cultivo en un tiempo determinado t, y posteriomente se analizaron autorradiográficamente los núcleos marcados de muestras de dicho cultivo a intervalos regulares. ¿Qué observación específica debe realizarse para determinar la duración de la fase G2?

(f) ¿Qué proporción de células en interfase se esperaría que tuviesen núcleos marcados en autorradiografías preparadas poco después de la exposición a la timidina marcada? (Asuma que el periodo de marcaje corresponde al tiempo suficiente para permitir que la timidina entre en la célula y se incorpore al DNA.)

19.3 Meselson y Stahl revisados. Aunque el modelo de la estructura del DNA de Watson y Crick sugería un mecanismo de replicación del DNA semiconservativo, al menos otros dos modelos pueden ser concebibles. En un *modelo conservativo*, la doble hélice del DNA parental permanece intacta y una segunda copia completa es generada de novo. En un *modelo dispersivo*, cada molécula hija está formada por una mezcla de segmentos viejos y de síntesis nueva.

(a) Comenzando con una doble hélice parental, haga un esquema de las moléculas hijas de dos ciclos de replicación para cada uno de estos modelos alternativos. Use un color para las cadenas parentales y otro color para todo el DNA sintetizado posteriormente (como se hace en la Figura 19.4 para el modelo semiconservativo).

(b) Indique, para cada uno de estos modelos alternativos, la distribución de las bandas que Messelson y Stahl habrían encontrado en sus gradientes de cloruro de cesio después de la primera y segunda ronda de replicación

19.4 Replicación del DNA. Dibuje la horquilla de replicación del DNA bacteriano en el que una hebra se replica discontinuamente y la otra continuamente. Enumere seis actividades enzimáticas diferentes relacionadas con el proceso de replicación, identifique la función de cada una de ellas, y señale en su dibujo dónde se encontraría cada una de ellas en la horquilla de replicación. Además, señale los siguientes aspectos en su dibujo: DNA molde, cebador de RNA, fragmentos de Okazaki y proteínas de unión a DNA de cadena sencilla.

•**19.5 Más replicación del DNA**. Las siguientes observaciones son de cinco experimentos diferentes llevados a cabo para determinar el mecanismo de replicación del DNA en el organismo hipotético *Fungus mungus*. En cada experimento, indique si el resultado apoya (A), refuta (R) o no tiene relación (NR) con la hipótesis de que este hongo replica su DNA mediante el mismo mecanismo se conoce para *E. coli*. Razone su respuesta en cada caso.

(a) Ninguna de las dos DNA polimerasas de *F.mungus* parece tener actividad exonucleasa.

(b) La replicación del DNA de *F. mungus* exhibe una síntesis discontinua de ambas cadenas de la horquilla de replicación.

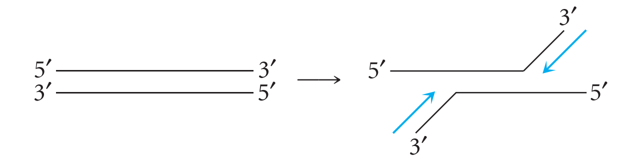
(c) Algunas secuencias de DNA de *F. mungus* tienen múltiples copias en el genoma, mientras que otras secuencias, sólo tienen una copia.

(d) Pequeños fragmentos de DNA aislados de *F. mungus* durante su replicación contienen tanto ribosa como desoxirribosa.

(e) Se han cultivado células de *F. mungus* en presencia de isótopos pesados de ^{15}N y ^{13}C durante varias generaciones y después se han cultivado en un medio normal (^{14}N y ^{12}C) durante otra generación; después se ha aislado y desnaturalizado el DNA de estas células. Las cadenas simples dan como resultado una única banda en un gradiente de densidad en cloruro de cesio.

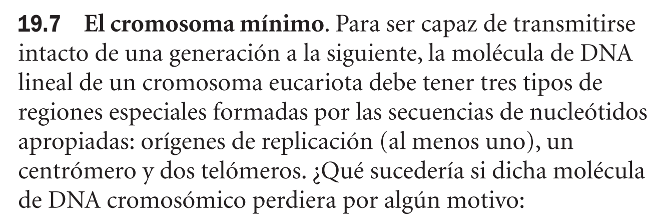
19.6 Aún más replicación del DNA. La replicación del DNA parece ser un proceso extremadamente complicado. Posiblemente evolucionó de procesos más simples en los que no existían mecanismos diferentes para la síntesis de la cadena conductora y de la cadena retrasada. En este proceso primitivo, la replicación del DNA habría sido del tipo de la cadena

conductora, que es menos complicado que el mecanismo para la cadena retrasada. Por ejemplo, el DNA podría haberse replicado por un mecanismo que implicase la síntesis de una cadena hija separadamente:



No obstante, hay algo erróneo en este dibujo. La síntesis de DNA requiere un cebador. Diseñe un modelo simple de síntesis de DNA que permitiese la producción de moléculas de DNA hijas completas mediante un mecanismo de replicación del DNA del tipo del de la cadena conductora. Entiéndase como modelo simple, uno que no necesite más de una enzima monofuncional, además de la DNA polimerasa primitiva. Asúmase que la «sopa primigenia» en la que está teniendo lugar la replicación del DNA, contiene un aporte adecuado de desoxinucleósidos trifosfato (dNTPs). (Existen varias soluciones a este problema.)

19.7 El cromosoma mínimo. Para ser capaz de transmitirse intacto de una generación a la siguiente, la molécula de DNA lineal de un cromosoma eucariota debe tener tres tipos de regiones especiales formadas por las secuencias de nucleótidos apropiadas: orígenes de replicación (al menos uno), un centrómero y dos telómeros. ¿Qué sucedería si dicha molécula de DNA cromosómico perdiera por algún motivo:



(a) todos sus orígenes de replicación?

(b) todo el DNA que constituye su centrómero?

(c) uno de sus telómeros?

19.8 Daño del DNA y su reparación. Indique si las siguientes afirmaciones son ciertas para la depurinación (DP), desaminación (DA), o formación de dímeros de pirimidina (DF). Una misma afirmación puede ser cierta para uno, todos o ninguno de estos procesos.

(a) Este proceso es causado por la hidrólisis espontánea de un enlace glicosídico.

(b) Este proceso es inducido por la luz ultravioleta.

(c) Puede ocurrirle a la guanina pero no a la citosina.

(d) Puede ocurrirle a la timina pero no a la adenina.

(e) Puede ocurrirle a la timina pero no a la citosina.

(f) La reparación implica a una DNA glicosilasa.

(g) La reparación implica a una endonucleasa.

(h) La reparación implica a la DNA ligasa.

(i) La reparación depende de la existencia de copias separadas de la información genética en las dos cadenas de la doble hélice.

(j) La reparación depende de la ruptura de las dos cadenas de la doble hélice.

19.9 Purinas y pirimidinas no estándar. En la Figura 19.43a se muestran tres bases nitrogenadas no estándar que están formadas por la desaminación de las bases que componen normalmente el DNA.

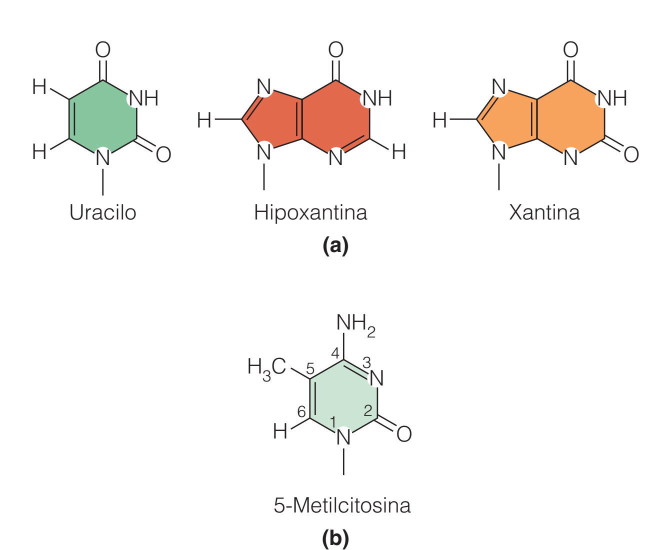


Figura 19.43 Estructuras de varias purinas y pirimidinas no estándar. *Véase* Problema 19.9.

(a) Indique qué base debe ser desaminada en el DNA para formar cada una de estas bases.

(b) ¿Por qué sólo se muestran tres bases, cuando el DNA está formado por cuatro?

(c) ¿Por qué es importante que ninguna de las bases que aquí se muestran formen parte del DNA natural?

(d) La Figura 19.43b muestra la 5-metilcitosina, una pirimidina que aparece de forma natural en el DNA cuando la citosina es metilada por enzimas celulares. ¿Por qué la presencia de esta base en la secuencia del DNA aumenta la probabilidad de la aparición de una mutación en este sitio?

•19.10 Movimiento de los cromosomas durante la mitosis. Es posible marcar los microtúbulos de un huso mediante la fotodecoloración con un microrayo láser (Figura 19.44). Cuando se hace, los cromosomas se desplazan *hacia* la zona decolorada durante la anafase. ¿Son las siguientes afirmaciones coherentes (C) o incoherentes (I) con este resultado experimental?

(a) Los microtúbulos mueven los cromosomas únicamente mediante su despolimerización en los polos del huso.

(b) Los cromosomas se mueven mediante la depolimerización de los microtúbulos en sus extremos situados en los cinetocoros.

(c) Los cromosomas se desplazan a lo largo de los microtúbulos por una proteína motora del cinetocoro que se mueve sobre la superficie del microtúbulo y «trae» el cromosoma con él.

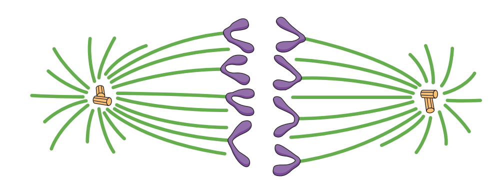
19.11 Más sobre las fases del ciclo celular. Indique, para cada una de los siguientes pares de fases del diclo celular, cómo podría distinguir cuál de las dos fases se encuentra una célula específica.

(a) G1 y G2

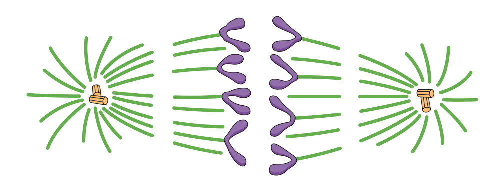
(b) G1 y S

(c) G2 y M

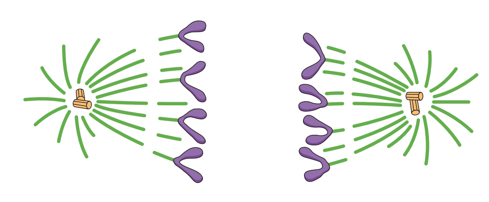
(d) G1 y M



Los microtúbulos se marcan con un anticuerpo fluorescente durante la anafase.



Se utiliza un microrayo láser para marcar dos áreas mediante el blanqueamiento del colorante fluorescente.



Se observa que los cromosomas se mueven hacia las zonas decoloradas.

Figura 19.44. Uso del fotoblanquamiento por láser en el estudio del movimiento de los cromosomas durante la mitosis. *Véase* Problema 19.10.

19.12 Regulación del ciclo celular. Una estrategia para el estudio de la regulación del ciclo celular ha sido fusionar células que se encontraban en diferentes etapas del ciclo celular y observar el efecto de la fusión en el núcleo de las células fusionadas (heterocariontes). Cuando se fusionan células en G1 con células en fase S, el núcleo de las células en fase G1 comienza la replicación más pronto de lo que lo habría hecho si las células no hubiesen sido fusionadas. Sin embargo, en las fusiones de células en G2 y en S, los núcleos continúan con sus actividades previas, aparentemente sin haberse visto afectadas por la fusión. La fusión entre células mitóticas y células en interfase siempre produce la condensación de la cromatina en el núcleo no mitótico. Basándose en estos resultados, identifique cuál de las siguientes afirmaciones acerca de la regulación del ciclo celular es probablemente verdadera (V), probablemente falsa (F), o no es posible sacar conclusiones con los datos (NP).

(a) La activación de la síntesis de DNA puede resultar de la actividad estimuladora de uno o más factores citoplásmicos.

(b) Se puede inducir la transición de S a G2 por la presencia de un factor citoplásmico que inhiba la síntesis de DNA.

(c) Se puede inducir la transición de G2 a mitosis por la presencia de uno o más factores que induzcan la condensación de la cromatina en el citoplasma de G2.

(d) G1 no es una fase obligatoria en todos los ciclos celulares.

(e) La transición de mitosis a G1 parece ser el resultado de la desaparición o inactivación de un factor citoplásmico presente durante la fase M.

•**19.13 Función de las quinasas dependientes de ciclina.** Basándose en el conocimiento que se tiene acerca de la regulación del ciclo celular eucariota, ¿cómo explicaría cada una de las siguientes observaciones experimentales?

(a) Cuando la Cdk-ciclina mitótica se inyecta en células que acaban de salir de la fase S, la condensación de los cromosomas y la ruptura de la envuelta nuclear sucede inmediatamente, en vez de sufrir el retraso normal de varias horas de G2.

(b) Cuando se introduce en las células una forma indestructible de la ciclina mitótica, entran en mitosis pero no pueden salir de ella y volver a entrar en la fase G1.

(c) Las mutaciones que inactivan la principal fosfatasa que se usa para catalizar la desfosforilación de proteínas, provocan un gran retraso en la reconstrucción de la envuelta nuclear que tiene lugar habitualmente al final de la mitosis.

•**19.14 Ruta de señalización de los factores de crecimiento.** Las siguientes cuestiones se centran en observaciones experimentales que están relacionadas con la determinación de la secuencia en que dos componentes clave de la ruta de Ras interaccionan entre sí.

(a) Cuando el factor de crecimiento epidérmico (EGF) se añade a células epiteliales, las proteínas Ras y Raf se activan. Basándose únicamente en esta observación, ¿qué conclusión se puede sacar de la relación entre Ras y Raf?

(b) En células mutantes que tienen una proteína Ras permanentemente inactivada, la adición de EGF no activa a la proteína Raf en la medida en que lo hace en las células normales. ¿Qué conclusión se puede sacar de esta observación?

Bibliografía recomendada

Las referencias con importancia histórica están marcadas con •.

Replicación del DNA

Alberts, B. DNA replication and recombination. *Nature* 421 (2003): 431

Bell, S. P. y A. Dutta. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* 71 (2002): 333.

de Lange, T. y R. A. DePinho. Unlimited mileage from telomerase? *Science* 283 (1999): 947.

DePamphilis, M. L., ed. *Concepts in Eukaryotic DNA Replication.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.

Greider, C. W. y E. H. Blackburn. Telomeres, telomerase, and cancer. *Sci. Amer.* 274 (February 1996): 92.

•Holmes, F. L. *Meselson, Stahl, and the Replication of DNA: A History of «The Most Beautiful Experiment in Biology»*. New Haven, CT: Yale University Press, 2001.

Hübscher, U., G. Maga y S. Spadari. Eukaryotic DNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.* 71 (2002): 133.
Méndez, J. y B. Stillman. Perpetuating the double helix: molecular machines at eukaryotic DNA replication origins. *BioEssays* 25 (2003): 1158.
•Meselson, M. y F. W. Stahl. The replication of DNA in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 44 (1958): 671.
Mullis, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Amer.* 262 (April 1990): 56.
•Ogawa, T. y R. Okazaki. Discontinuous DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* 49 (1980): 421.
•Watson, J. D. y F. H. C. Crick. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171 (1953): 964.

Reparación del DNA

Cline, S. D. y P. C. Hanawalt. Who's on first in the cellular response to DNA damage? *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* 4 (2003): 361.
Friedberg, E. C. DNA damage and repair. *Nature* 421 (2003): 436.
Lieber, M. R., *et al.* Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* 4 (2003): 712.
Sancar, A., *et al.* Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* 73 (2004): 39.

División nuclear y celular

Endow, S. A. y D. M. Glover, eds. *The Dynamics of Cell Division.* New York: Oxford University Press, 1998.
Glotzer, M. Animal cell cytokinesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17 (2001): 351.
Glover, D. M., C. Gonzalez y J. W. Raff. The centrosome. *Sci. Amer.* 268 (June 1993): 62.
McIntosh, J. R., E. L. Grishchuk y R. R. West. Chromosome-microtubule interactions during mitosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18 (2002): 193.
Mitchison, T. J. y E. D. Salmon. Mitosis: A history of division. *Nature Cell Biol.* 3 (2001): E17.
Robinson, D. N. y J. A. Spudich. Towards a molecular understanding of cytokinesis. *Trends Cell Biol.* 10 (2000): 228.
Rogers, G. C., *et al.* Two mitotic kinesins cooperate to drive sister chromatid separation during anaphase. *Nature* 427 (2004): 364.
Scholey, J. M., I. Brust-Mascher, and A. Mogilner. Cell division. *Nature* 422 (2003): 746.
Wittman, T., A. Hyman y A. Desai. The spindle: A dynamic assembly of microtubules and motors. *Nature Cell Biol.* 3 (2001): E28.

Regulación del ciclo celular

den Boer, B. G. W. y J. A. H. Murray. Triggering the cell cycle in plants. *Trends Cell Biol.* 10 (2000): 245.
Haering, C. H. y K. Nasmyth. Building and breaking bridges between sister chromatids. *BioEssays* 25 (2003): 1178.
Hutchison, C. J. y D. Glover, eds. *Cell-Cycle Control.* New York: IRL (Oxford University Press), 1995.
King, R. W., R. J. Deshaies, J. M. Peters, and M. W. Kirschner. How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 274 (1996): 1652.
Maller, J. L. Maturation-promoting factor in the early days. *Trends Biochem. Sci.* 20 (1995): 524.
Murray, A. W. y T. Hunt. *The Cell Cycle: An Introduction.* New York: W. H. Freeman, 1993.
Musacchio, A. y K. G. Hardwick. The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nature Review Mol. Cell Biol.* 3 (2002): 731.
Nasmyth, K. A prize for proliferation. *Cell* 107 (2001): 689.
Nigg, E. A. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* 2 (2001): 21.
Nurse, P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 100 (2000): 71.
Weinberg, R. A. The retinoblastoma protein and cell-cycle control. *Cell* 81 (1995): 323.

20

Reproducción sexual, meiosis y recombinación genética

La mayoría de las células eucariotas utilizan la división celular por mitosis, de la que hemos tratado en el capítulo anterior, para proliferar, consiguiendo así producir más organismos o más células por organismo. Puesto que un ciclo de división celular por mitosis implica la replicación del DNA seguida de la segregación de las dos cromátidas idénticas en las dos células hijas, la división mitótica produce células genéticamente idénticas o casi. Esta capacidad para perpetuar los caracteres genéticos fielmente le permite a la división mitótica formar la base de la **reproducción asexual** en eucariotas. Durante la reproducción asexual, se generan nuevos individuos por la división mitótica de las células de un organismo monoparental, bien sea unicelular o multicelular. Aunque los detalles varían en función del organismo, la reproducción asexual está ampliamente extendida en la naturaleza. Los ejemplos incluyen la *división mitótica* de organismos unicelulares, la *gemación* de descendencia a partir del cuerpo de un parental multicelular, y la *regeneración* de organismos completos a partir de fragmentos de un organismo parental. En las plantas, los organismos completos se pueden generar, incluso, a partir de células aisladas procedentes de una planta adulta.

La reproducción asexual puede ser un modo de perpetuar las especies eficaz y con éxito evolutivo. Mientras que las condiciones medioambientales se mantienen constantes, la genética previsible de la reproducción asexual está perfectamente adaptada para mantener la supervivencia de una población. Pero, si el entorno cambia, una población que se reproduce asexualmente puede no ser capaz de adaptarse a las nuevas circunstancias. En estas condiciones, normalmente, los organismos que se reproducen sexualmente suelen tener ventaja sobre los que lo hacen asexualmente, como veremos ahora.

Reproducción sexual

En comparación con la reproducción asexual, en donde la progenie es genéticamente idéntica a la del único parental del que procede, la **reproducción sexual** permite que la información genética de los dos parentales se mezcle produciendo así, una descendencia, desde el punto de vista genético, ligeramente diferente entre sí y con respecto a los padres. Además, la descendencia presenta diferencias no predecibles; es decir, no podemos anticipar exactamente qué combinación de genes recibirá un descendiente en concreto de sus dos padres. Puesto que la mayoría de animales y plantas —e incluso muchos microorganismos— se reproducen sexualmente, este tipo de reproducción debe proporcionar claras ventajas.

La reproducción sexual produce variabilidad genética debido a que reúne cromosomas de dos padres diferentes

La reproducción sexual permite que los caracteres genéticos presentes en los diferentes individuos se combinen de formas diversas en la descendencia recién desarrollada, generando una gran variabilidad entre los individuos que componen una población. La variabilidad genética depende en última instancia de la existencia de *mutaciones*, que son alteraciones no predecibles de la secuencia de bases de DNA. Las mutaciones son raras y las mutaciones beneficiosas son aún más raras. Pero cuando aparecen las mutaciones beneficiosas, es claramente ventajoso preservarlas en la población. Puede ser incluso más beneficioso reunir las mutaciones en varias combinaciones —y en esto radica una de las ventajas de la reproducción sexual—. Aunque las mutaciones se producen tanto en las especies sexuales como en las asexuales,

sólo la reproducción sexual puede producir una mezcla de la información genética con cada nueva descendencia.

Puesto que la reproducción sexual combina información genética de dos parentales diferentes en un único descendiente, un organismo que se reproduce sexualmente tiene, en algún punto de su ciclo vital, células que contienen dos copias de cada cromosoma, cada una heredada de un parental. Los dos miembros de cada pareja de cromosomas se denominan **cromosomas homólogos**. Los dos cromosomas homólogos llevan el mismo alineamiento de genes, aunque para un gen dado, las dos versiones pueden diferir ligeramente en la secuencia de bases. Cuando los cromosomas homólogos se observan al microscopio, no sorprende comprobar que normalmente se parecen (*véase* Figura 19.23). Una excepción a esta regla son los **cromosomas sexuales**, que determinan si un individuo es masculino o femenino. Los dos tipos de cromosomas sexuales, generalmente denominados X e Y, difieren significativamente tanto en estructura genética como en apariencia. Por ejemplo, en los mamíferos, las hembras tienen dos cromosomas X del mismo tamaño, mientras que los machos tienen un cromosoma X y un cromosoma Y que es mucho más pequeño. Sin embargo, partes del cromosoma X y del cromosoma Y son en realidad homólogos, y durante la reproducción sexual los cromosomas X e Y se comportan como homólogos.

Se dice que una célula u organismo con dos juegos de cromosomas es **diploide** (de la palabra griega *diplous*, que significa «doble») y contiene dos copias de su genoma. Una célula u organismo con un único juego de cromosomas, y por tanto, con una única copia de su genoma, es haploide (de la palabra griega *haplous*, que significa «única». Por convención, el número haploide de cromosomas para una especie se designa como n (o $1n$) y el número diploide $2n$. Por ejemplo, en humanos $n = 23$ que significa que la mayoría de las células humanas contienen dos juegos de 23 cromosomas, produciendo un número diploide total de 46. El estado diploide es una característica esencial del ciclo de vida de las especies con reproducción sexual. En cierto sentido, una célula diploide, contiene un juego extra de genes que está disponible para mutación e innovación genética. Los cambios en la segunda copia de un gen normalmente no amenazan la supervivencia de un organismo, incluso si la mutación impide la función original de esa copia del gen en particular. En suma, el estado diploide proporciona cierta protección contra daños cromosómicos; si un cromosoma se rompe de manera accidental, a veces se puede reparar utilizando como molde, la secuencia del DNA del cromosoma homólogo (página 629).

Las células diploides pueden ser homocigotas o heterocigotas para cada gen

Para explorar en detalle las consecuencias genéticas del estado diploide, nos vamos a centrar en el comportamiento de un **locus** (en plural: **loci**) **génico,** que es el lugar en el cromosoma, donde se sitúa la secuencia de DNA para un gen en particular. Para simplificar, asumimos que el gen controla una única característica bien definida —o *carácter* como dicen normalmente los genetistas— en el organismo. Vamos a asumir que por genoma haploide hay presente una única copia de este gen, de modo que un organismo diploide tendrá dos copias del gen, que pueden ser idénticas o ligeramente diferentes. Las dos versiones del gen se denominan **alelos** y la combinación de alelos determina cómo un organismo expresará el carácter controlado por el gen. En los guisantes de jardín, los alelos de un locus en particular determinan el color de la semilla, que puede ser verde o amarilla (Figura 20.1). De un organismo que tiene dos alelos idénticos para un gen dado, se dice que es homocigoto para ese gen o carácter. Además, de una planta de guisante que haya heredado de sus dos padres el mismo alelo para el color amarillo de la semilla, se dice que es homocigota para el color de la semilla. De un organismo con dos alelos diferentes para un gen, se dice que es heterocigoto para ese gen o para el carácter que determina. Una planta de guisante con un alelo que especifica el color de la semilla amarillo y un segundo alelo que especifica el color de la semilla en verde es, por tanto, un heterocigoto para el color de la semilla.

En un individuo heterocigoto, a menudo uno de los dos alelos es **dominante** y el otro **recesivo**. Estos términos transmiten la idea de que el alelo dominante determina cómo aparecerá el carácter en un individuo heterocigoto. (La palabra *carácter* se refiere a una variante particular de un rasgo, tal como semillas amarillas o verdes, donde el carácter es el color de la semilla.) Para el color de la semilla en el guisante, el color amarillo es dominante sobre el verde; esto quiere decir que las plantas del guisante heterocigotas para el color de la semilla tienen semillas de color amarillo. Un

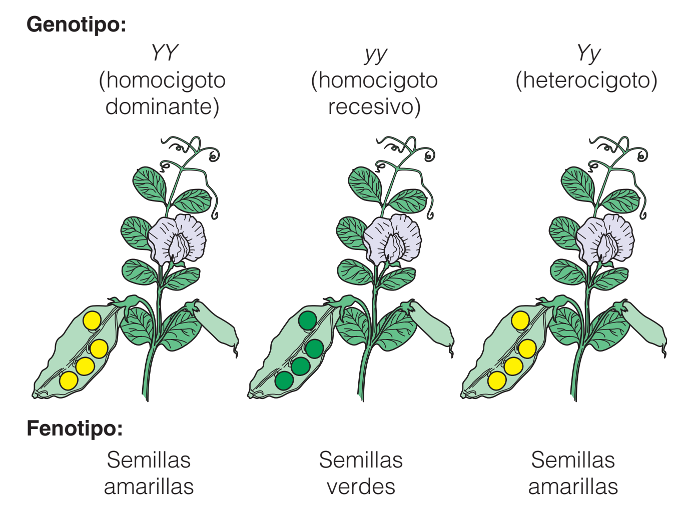


Figura 20.1 Genotipo y fenotipo. En los guisantes de jardín, el color de la semilla (fenotipo) puede ser amarillo o verde. Los alelos del color de la semilla son *Y* (amarillo, dominante) o *y* (verde, recesivo). Puesto que la planta del guisante es un organismo diploide, su carácter genético (genotipo) para el color de la semilla puede ser homocigoto dominante (*YY*), homocigoto recesivo (*yy*), o heterocigoto (*Yy*).

alelo dominante se designa normalmente por una letra mayúscula que rige para el carácter, mientras que el alelo recesivo correspondiente se representa por la misma letra en minúscula. En ambos casos, se utilizan itálicas. Por tanto, los alelos para el color de la semilla en los guisantes se representa como *Y* para el amarillo e *y* para el verde, ya que el carácter amarillo es el dominante. Como ilustra la Figura 20.1, una planta de guisante puede ser homocigota para el alelo dominante (*YY*), homocigota para el alelo recesivo (*yy*), o heterocigota (*Yy*).

Es importante distinguir entre el **genotipo** o estructura genética de un organismo y su **fenotipo** o la expresión física de su genotipo. Normalmente el fenotipo de un organismo se determina por inspección (es decir, observando si las semillas son verdes o amarillas). Por otro lado, el genotipo sólo puede ser determinado *directamente*, sólo por el estudio del DNA del organismo, aunque se puede deducir por evidencias indirectas, tales como el fenotipo del organismo e información acerca de los fenotipos de sus padres y/o de sus descendientes. Los organismos que muestran el mismo fenotipo no tienen necesariamente genotipos idénticos. En el ejemplo de la Figura 20.1, las plantas de guisante con semillas amarillas (fenotipo) pueden ser o *YY* o *Yy* (genotipo). La Figura 20.2 resume la terminología genética que acabamos de introducir.

Los gametos son células haploides especializadas para la reproducción sexual

La marca de distinción de la reproducción sexual es que la información genética aportada por los dos padres se reúne en un único individuo. Puesto que la descendencia de la reproducción sexual es diploide, la contribución de cada parental debe ser haploide. Las células haploides producidas por cada parental que se fusionan para formar una descendencia diploide se denominan **gametos**, y el proceso que los produce **gametogénesis**. Los genetistas distinguen entre individuos masculinos y femeninos basándose en los gametos que producen. Los gametos producidos por los varones, denominado **esperma** (o *espermatozoides*), son normalmente bastante pequeños y pueden ser, de forma inherente, móviles. Los gametos femeninos, denominados **huevos** u **óvulos** (en singular: **óvulo**), están especializados en el almacenamiento de nutrientes y tienden a ser bastante grandes e inmóviles. Por ejemplo, en los erizos de mar, el volumen de una célula huevo es más de 10.000 veces mayor que el de las células espermáticas; en aves y anfibios, que tienen huevos con yemas enormes, la diferencia de tamaño es incluso mayor. Pero a pesar de sus diferentes tamaños, los espermatozoides y los óvulos proporcionan igual cantidad de DNA a la descendencia.

La unión del espermatozoide y del óvulo durante la reproducción sexual se denomina fertilización. El huevo fertilizado resultante, o zigoto, es diploide y ha recibido un juego de cromosomas del espermatozoide y un juego homólogo del óvulo. En el ciclo vital de los organismos multicelulares, la fertilización va seguida por el desarrollo embrionario, una serie de divisiones mitóticas y progresiva especialización de varios grupos de células para formar un embrión multicelular, y finalmente un adulto.

Sin embargo, la distinción entre parentales masculinos y femeninos no es universal. Por ejemplo, los gametos pro-

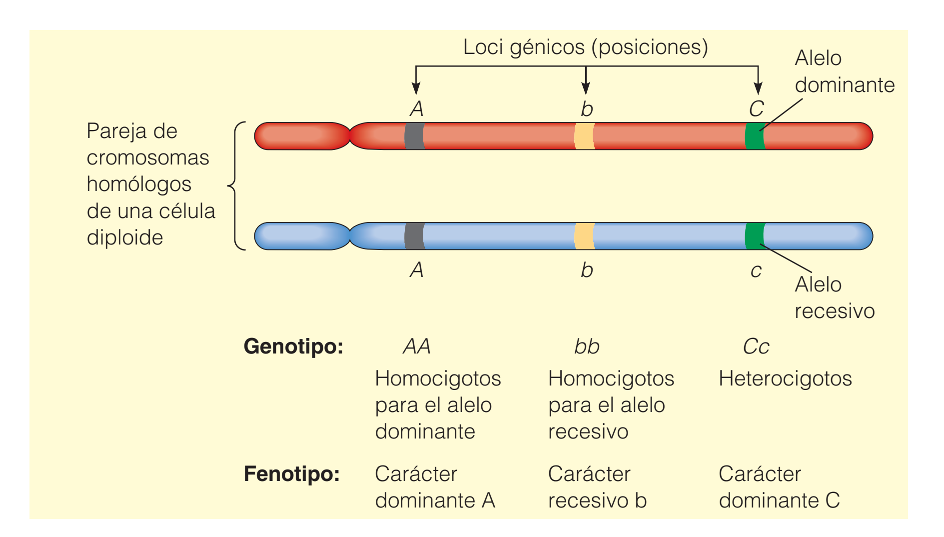


Figura 20.2 Algunos términos genéticos. El diagrama muestra una pareja de cromosomas homólogos de una célula diploide; los cromosomas tienen el mismo tamaño y forma, y portan genes para los mismos caracteres (características), en el mismo orden. El sitio de un gen en un cromosoma se llama locus génico. Las versiones particulares de un gen —alelos— encontrados en loci génicos comparables de cromosomas homólogos, pueden ser idénticos (proporcionándole a ese organismo un genotipo que es homocigoto para ese gen) o diferentes (haciendo el genotipo heterocigoto). Si un alelo de un gen es dominante y el otro recesivo, el organismo heterocigótico muestra un fenotipo dominante con respecto al carácter en cuestión. Un carácter fenotípico recesivo se observa solamente si el genotipo es homocigótico para el alelo recesivo. El azul y el rojo se utilizan aquí y en las figuras posteriores para distinguir el origen parental diferente de los dos cromosomas.

ducidos por ciertos hongos o eucariotas unicelulares son, en apariencia, idénticos pero difieren ligeramente a nivel molecular. Se dice de tales gametos que difieren en **el tipo de apareamiento**. La unión de dos gametos requiere que sean de diferentes tipos de apareamiento, pero el número de tipos de apareamiento posibles en una especie, puede ser superior a dos, en algunos casos, ¡a más de diez!

Meiosis

Puesto que los gametos son haploides, no se pueden producir a partir de células diploides por mitosis ya que la mitosis crea células hijas que son genéticamente idénticas a la célula parental original. En otras palabras si los gametos se forman por la división mitótica de células diploides, tanto el espermatozoide como el óvulo tendrían un número de cromosomas diploide, igual que las células parentales. El hipotético zigoto creado a partir de la fusión de tales gametos diploides, sería *tetraploide* (es decir, poseería *cuatro* juegos de cromosomas homólogos). Además, el número de cromosomas continuaría duplicándose en cada generación sucesiva —un escenario imposible—. Además, para que el número cromosómico se mantenga constante de generación en generación durante la formación de los gametos debe producirse un tipo de división celular diferente. Este tipo especial de división, denominada **meiosis**, reduce el número cromosómico de diploide a haploide.

La meiosis implica un ciclo de replicación de DNA cromosómico seguido por dos divisiones nucleares sucesivas. Esto tiene como resultado, la formación de cuatro núcleos hijos (normalmente en células hijas separadas) que contienen un juego haploide de cromosomas por núcleo. La Figura 20.3 destaca el principio de la meiosis empezando por una célula diploide que contiene cuatro cromosomas ($2n = 4$). Un único ciclo de replicación de DNA se continúa con dos divisiones celulares, la meiosis I y la meiosis II, que conducen a la formación de cuatro células haploides.

Los ciclos vitales de los organismos con reproducción sexual tienen fases diploides y haploides

La meiosis y la fertilización son componentes indispensables del ciclo vital de todos los organismos que se reproducen sexualmente, ya que la duplicación del número de cromosomas que tiene lugar en la fertilización se equilibra con la división a la mitad que se produce durante la meiosis. Como resultado, el ciclo vital de los organismos que se reproducen sexualmente se divide en dos fases: una fase diploide ($2n$) y una fase haploide ($1n$). La fase diploide comienza en la fertilización y dura hasta la meiosis, mientras que la fase haploide se inicia en la meiosis y termina con la fertilización.

Como se muestra en la Figura 20.4, los organismos de algunos grupos representativos difieren en la importancia

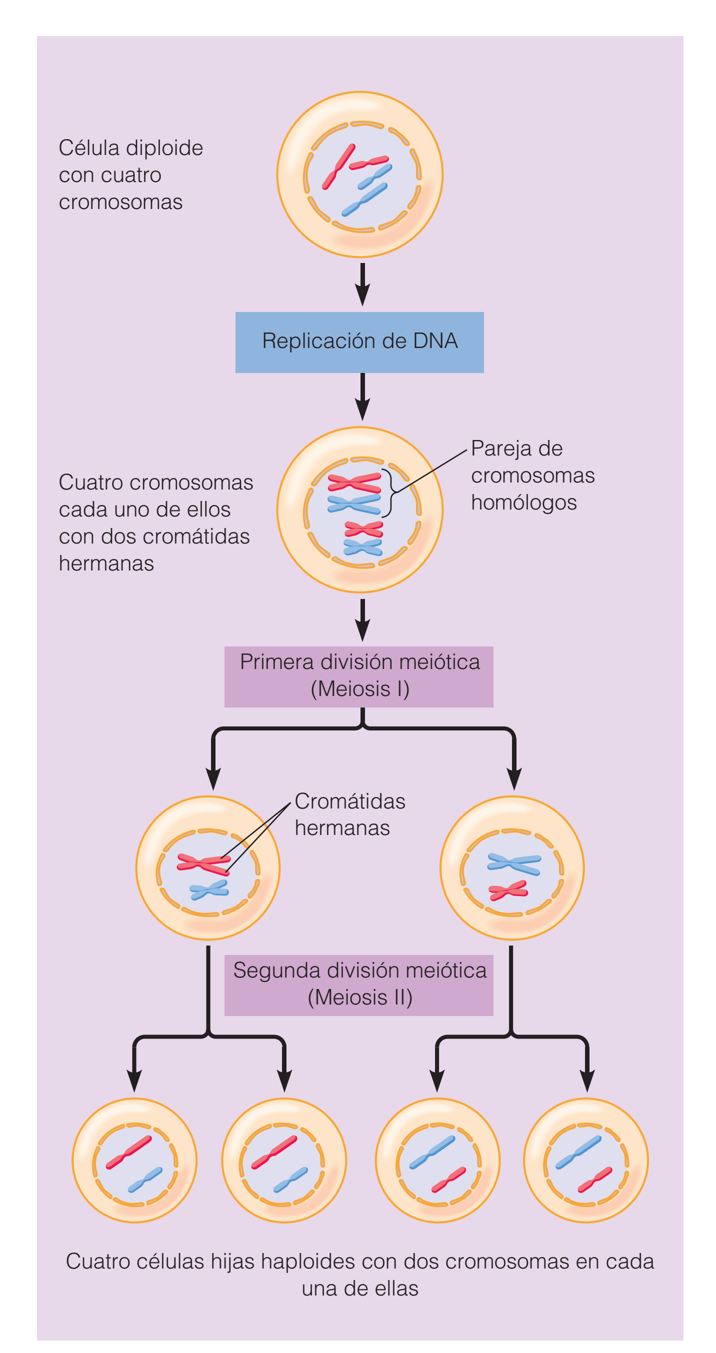


Figura 20.3 El principio de la meiosis. La meiosis implica un único ciclo de replicación de DNA (duplicación de cromosomas) de una célula diploide seguido de dos divisiones celulares sucesivas. En este ejemplo, la célula diploide tiene sólo cuatro cromosomas, que se pueden agrupar en dos parejas homólogas. Después de la replicación del DNA, cada cromosoma consta de dos cromátidas hermanas. En la primera división meiótica (meiosis I), los cromosomas homólogos se separan, pero las cromátidas hermanas se mantienen unidas. En la segunda división meiótica (meiosis II), las cromátidas hermanas se separan siendo el resultado cuatro células hijas haploides, con dos cromosomas cada una. Fíjese que cada célula haploide tiene un cromosoma de cada pareja de homólogos presente en la célula diploide. Para simplificar, los efectos del sobrecruzamiento y de la recombinación genética no se muestran en este diagrama.

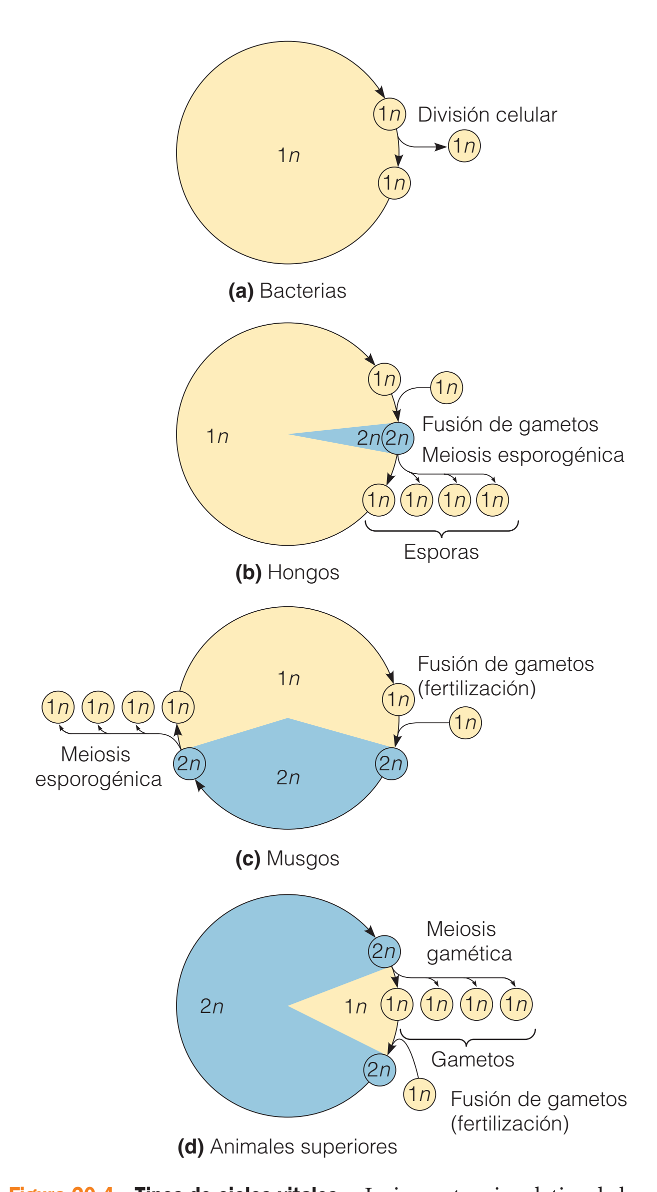


Figura 20.4 Tipos de ciclos vitales. La importancia relativa de las fases haploide (n) y diploide ($2n$) del ciclo vital difieren enormemente, dependiendo del organismo. (**a**) Las bacterias existen exclusivamente en estado haploide. (**b**) Muchos hongos ejemplifican una forma de vida predominantemente haploide pero con una fase diploide corta. Puesto que los productos de la meiosis de los hongos son esporas haploides, este tipo de meiosis se denomina meiosis esporogénica. Las esporas dan lugar a células haploides, algunas de las cuales se convierten posteriormente en gametos (sin meiosis). (**c**) Los musgos (y también los líquenes) alternan entre formas haploides y diploides, siendo las dos fases, componentes significativos en los ciclos de vida de estos organismos. La meiosis esporogénica produce esporas haploides, que en este caso crecen dando lugar a plantas haploides. Finalmente, algunas de las células de las plantas haploides se diferencian en gametos. (En las plantas con semillas, como las coníferas y las plantas con flores, las formas haploides del organismo son vestigiales, consistiendo cada una en sólo un número pequeño de células.) (**d**) Los animales superiores son el mejor ejemplo de organismos que son predominantemente diploides, donde sólo los gametos representan la fase haploide del ciclo vital. De los animales se dice que tienen una meiosis gamética, puesto que los productos inmediatos de la meiosis son gametos haploides.

relativa de las fases haploide y diploide de sus ciclos vitales. Los hongos son un ejemplo de organismos que se reproducen sexualmente, cuyo ciclo vital es inicialmente haploide pero incluye una breve fase diploide que empieza con la fusión de gametos (el equivalente en los hongos a la fertilización) y termina con la meiosis (Figura 20.4b). Normalmente la meiosis tiene lugar casi inmediatamente después de la fusión de gametos, de manera que la fase diploide es muy corta, y, de acuerdo con esto sólo una pequeña fracción de núcleos fúngicos son diploides al mismo tiempo. Los gametos de los hongos se desarrollan, sin meiosis, a partir de células que son ya haploides.

Probablemente los musgos y los helechos son los mejores ejemplos de organismos en los que las fases haploide y diploide son características destacadas del ciclo vital. Cada especie de estas plantas tiene dos formas multicelulares y morfológicamente diferentes, alternativas, una haploide y la otra diploide (Figura 20.4c). Para los musgos, la forma haploide del organismo es más grande y más prominente y la forma diploide es más pequeña y tiene una vida más corta. Para los helechos, es de otra manera. En ambos casos, los gametos se desarrollan a partir de células haploides preexistentes.

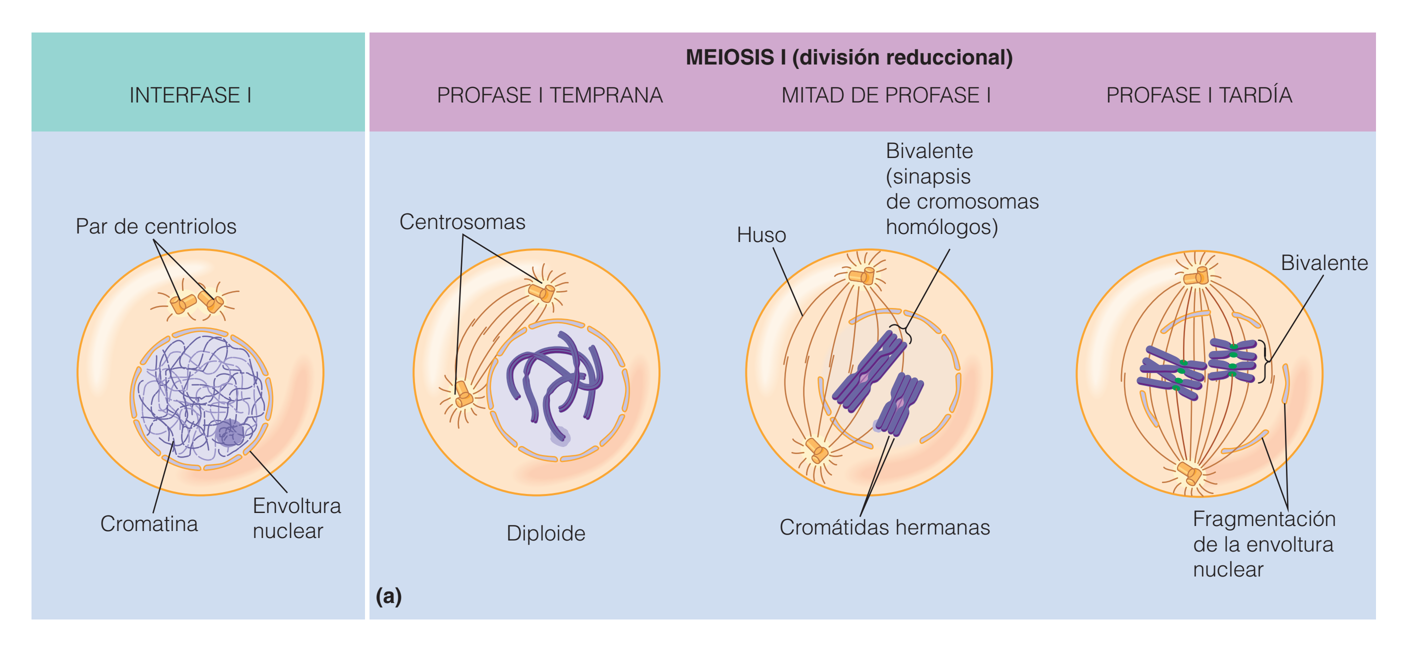
De los organismos que alternan, de esta manera, entre formas multicelulares haploides y diploides, se dice que presentan **alternancia de generaciones** en sus ciclos vitales. Además de musgos y líquenes, algas eucarióticas y otras plantas muestran alternancia entre generaciones diploides y haploides. En tales organismos, los productos de la meiosis son **esporas haploides**, que después de la germinación dan lugar por división celular mitótica a la forma haploide de la planta o del alga. La forma haploide, en cambio, produce los gametos por especialización de las células que son ya haploides. Los gametos, después de la fertilización, dan lugar a la forma diploide. Puesto que la forma diploide produce esporas, se denomina **esporofito** (planta que produce esporas). La forma haploide produce gametos y se denomina por tanto **gametofito**. Mientras que todas las plantas muestran alternancia de generaciones, en la mayoría de los casos la generación de esporofitos predomina. En las plantas con flores, por ejemplo, la generación del gametofito es una estructura casi vestigial localizada en la flor (gametofito femenino en el *carpelo*, gametofito masculino en las *anteras* de la flor).

Los mejores ejemplos de ciclos vitales dominados por la fase diploide se encuentran en los animales (Figura 20.4d). En tales organismos, incluidos los humanos, la meiosis no da lugar a esporas sino directamente a gametos, de manera que la fase haploide del ciclo vital viene representada sólo por los gametos. En tales especies, la meiosis se denomina meiosis gamética para distinguirla de la meiosis que genera esporas observada en los organismos que producen esporas y que exhiben una alternancia de generaciones. La meiosis es, además, gamética en los animales y formadora de esporas en las plantas.

La meiosis convierte una célula diploide en cuatro células haploides

La meiosis, cuando sucede en el ciclo vital de un organismo, va siempre precedida por la duplicación de los cromosomas de una célula diploide e implica dos divisiones sucesivas que convierten el núcleo diploide en cuatro núcleos haploides. La Figura 20.5 ilustra las diferentes fases de la meiosis; remítase a ella a medida que lea la siguiente explicación.

A la primera división meiótica o meiosis I, se le denomina a veces *División Reduccional* de la meiosis porque es el



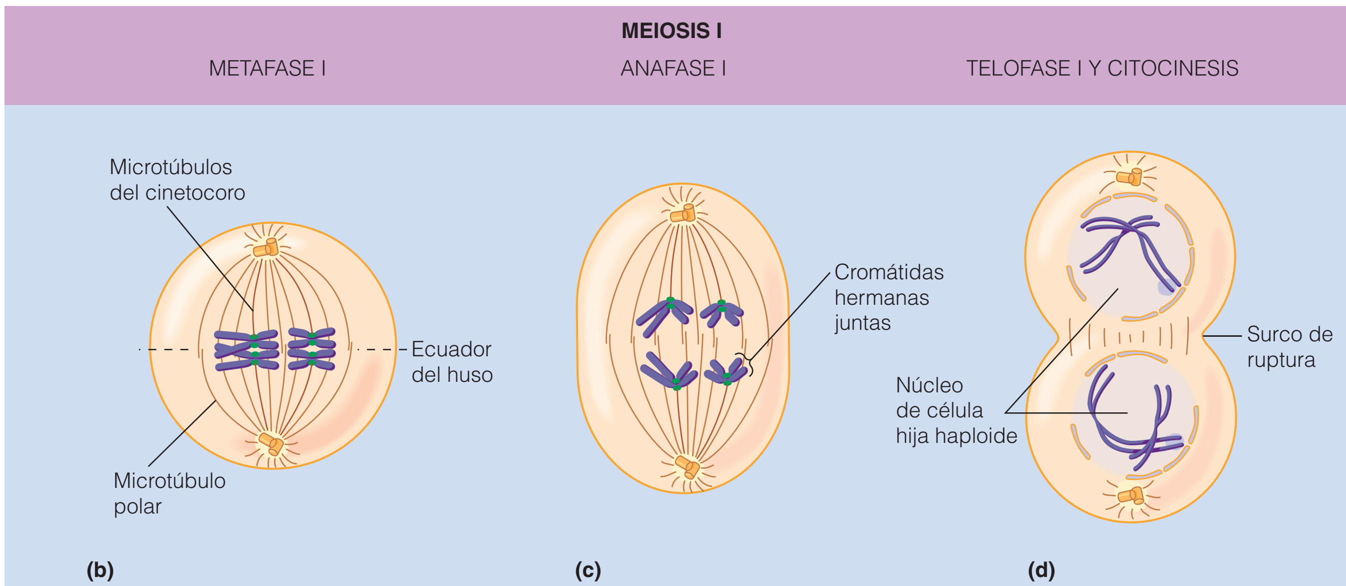
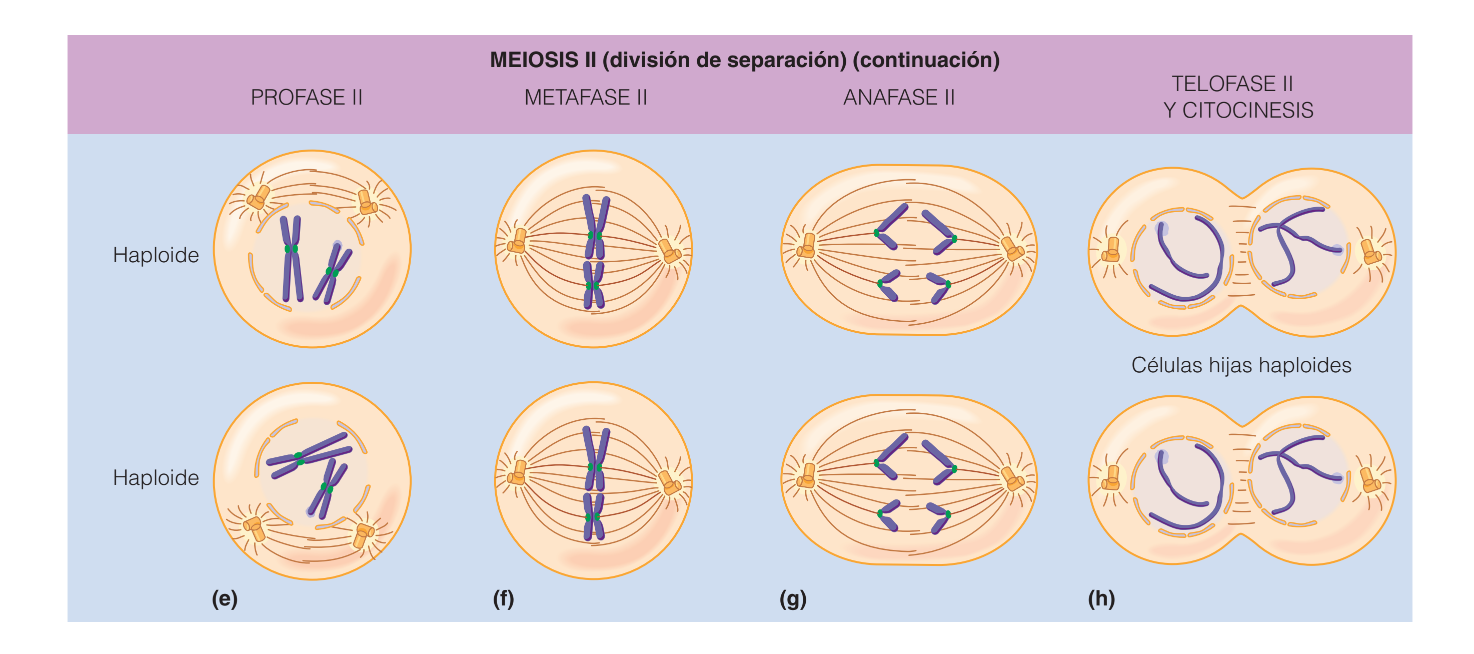


Figura 20.5 Meiosis en una célula animal. La meiosis consiste en dos divisiones sucesivas, denominadas meiosis I y meiosis II, en donde no interviene síntesis de DNA ni duplicación de cromosomas. (**a**) Durante la profase I, los cromosomas (duplicados durante la fase S previa) se condensan y los dos centrosomas migran hacia polos opuestos de la célula. Cada cromosoma (cuatro en este ejemplo) constan de dos cromátidas hermanas. Los cromosomas homólogos se emparejan para formar bivalentes. (**b**) Los bivalentes se alinean en el ecuador del huso (metafase I). (**c**) Los cromosomas homólogos se separan durante la anafase I, pero las cromátidas hermanas se mantienen unidas en el centrómero. (**d**) Continúan la telofase y la citocinesis. Aunque no se ilustra aquí, puede haber una interfase corta (interfase II). En la meiosis II, (**e**) los cromosomas se recondensan (profase II), (**f**) los cromosomas se alinean en el ecuador del huso (metafase II), y (**g**) por fin, las cromátidas hermanas se separan (anafase II). (**h**) Después de la telofase II y de la citocinesis, el resultado son cuatro células hijas haploides, conteniendo cada una de ellas, un cromosoma de cada pareja de homólogos. La profase I es un proceso complicado que se muestra en más detalle en la Figura 20.7. La meiosis en las plantas es similar, excepto por la ausencia de centriolos y el mecanismo de citocinesis, que implica la formación de una placa celular (descrita en el Capítulo 19).



acontecimiento que reduce el número de cromosomas de diploide a haploide. En los primeros estadios de la meiosis I, los dos cromosomas de cada par de homólogos se acercan durante la profase para intercambiar información genética (usando un mecanismo que discutiremos en breve). Este emparejamiento de cromosomas homólogos denominado **sinapsis** se produce únicamente en la meiosis; en otras ocasiones, incluyendo la mitosis, los cromosomas de la pareja de homólogos se comportan de manera independiente. Los dos cromosomas de cada pareja de homólogos se unen tan estrechamente durante la profase de la primera división meiótica que se comportan como una única unidad, denominada un **bivalente** (o *tétrada*, que enfatiza que cada uno de los dos cromosomas homólogos consiste en dos cromátidas hermanas, resultando en un total de cuatro cromátidas). Después de alinearse en el ecuador del huso cada bivalente se escinde de tal manera que sus dos cromosomas homólogos se mueven hacia polos opuestos del huso. Como resultado de esto, cada núcleo hijo producido por la primera división meiótica es haploide debido a que sólo contiene uno de los dos cromosomas de cada bivalente. Durante la segunda división meiótica (meiosis II), que se asemeja a una división mitótica, las dos cromátidas hermanas de cada cromosoma se separan en las dos células hijas. Por tanto, los acontecimientos únicos de la meiosis suceden durante la primera división meiótica: la sinapsis de cromosomas homólogos y su posterior segregación en diferentes núcleos hijos.

Cada división meiótica implica las mismas etapas básicas de la mitosis, aunque los biólogos celulares normalmente no distinguen la prometafase como una fase separada. Por tanto, las fases meióticas son *profase*, *metafase*, *anafase* y *telofase*. Veremos en breve que la profase I es mucho más larga y más complicada que la profase mitótica, mientras que la profase II tiende a ser bastante corta. Otra diferencia importante con la mitosis es que entre las dos divisiones meióticas no interviene una interfase normal. Si tiene lugar una interfase, es normalmente muy corta —y lo que es más importante— no incluye la replicación del DNA puesto que cada cromosoma ya consiste en una pareja de cromátidas hermanas replicadas, que se habían generado antes de la primera división meiótica. El propósito de la segunda división meiótica, como el de una división mitótica típica, es repartir estas cromátidas hermanas en dos núcleos hijos.

Las micrografías de la Figura 20.6 muestran cómo aparecen los cromosomas en varios puntos de la meiosis. Como puede ver hay varias etapas distintas en la profase I; trataremos esto, a medida que examinemos la meiosis I en detalle en la siguiente sección.

La meiosis I produce dos células haploides que tienen cromosomas compuestos por cromátidas hermanas

La primera división meiótica segrega a los cromosomas homólogos en diferentes células hijas. Esta característica de la meiosis tiene una significación genética especial ya que es en esta etapa del ciclo vital de un organismo cuando los dos alelos de cada gen se separan. Es la separación de los alelos la que hace posible la mezcla eventual de los diferentes pares de alelos en la fertilización. Durante la primera división meiótica, existen acontecimientos de gran significación que implican el intercambio físico de fragmentos de moléculas de DNA. Los biólogos moleculares denominan al intercambio de segmentos de DNA entre dos fuentes diferentes, **recombinación genética**. Como veremos en breve, este tipo de intercambio de DNA entre cromosomas homólogos tiene lugar cuando los cromosomas están en sinapsis durante la profase I.

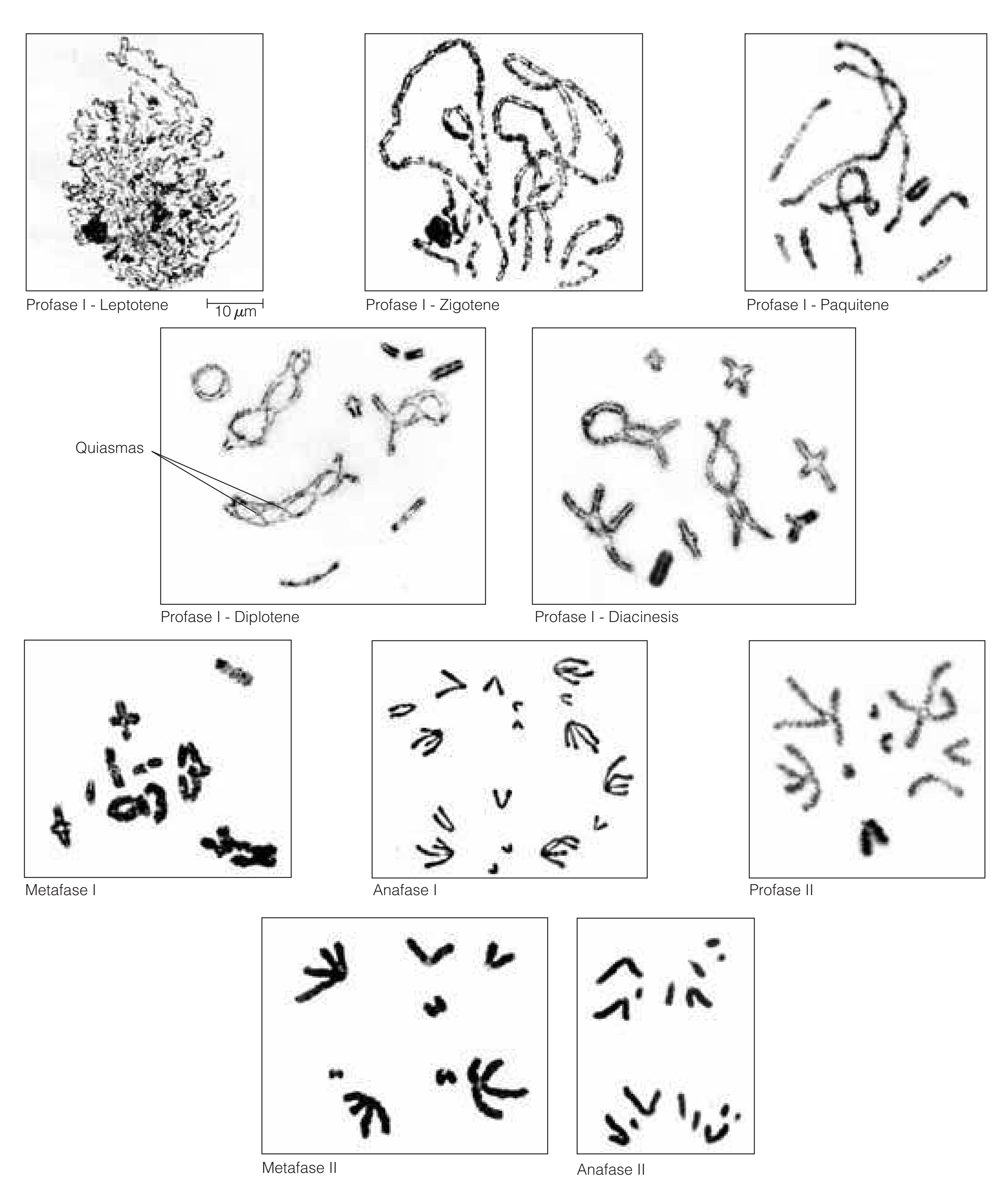


Figura 20.6 Apariencia de los cromosomas durante las diferentes etapas de la meiosis. Los cromosomas homólogos se emparejan durante zigotene, y se acortan y engruesan en la etapa de paquitene. Durante diplotene, las cuatro cromátidas presentes en cada bivalente se pueden distinguir; en esta etapa los quiasmas son visibles. Durante la anafase I, cada célula de nueva formación recibe un miembro de cada par de cromosomas homólogos. En metafase II, cada cromosoma consiste en un par de cromátidas que se mantienen unidas por un centrómero. Durante la anafase II, los centrómeros se escinden, permitiendo que las cromátidas se separen y migren en direcciones opuestas.

Profase I: los cromosomas homólogos se emparejan e intercambian DNA. La profase I es una fase particularmente larga y compleja. Basándonos en las observaciones al microscopio óptico, los primeros biólogos celulares dividieron la profase I en cinco etapas denominadas *leptotene, zigotene, paquitene, diplotene y diacinesis* (Figura 20.7).

La etapa de **leptotene** empieza con la condensación de las fibras de cromatina en estructuras largas y filamentosas, similares a las que se producen al inicio de la mitosis. En **zigotene**, la condensación continuada hace que se distingan los cromosomas individualizados y que los cromosomas homólogos se emparejen estrechamente mediante el proceso de la sinapsis, formando bivalentes. Recuerde que cada bivalente tiene cuatro cromátidas, dos derivan de cada cromosoma. La formación de los bivalentes tiene una consideración genética importante ya que la cercanía entre los dos cromosomas homólogos permite a los segmentos de DNA intercambiarse, por un proceso denominado **sobrecruzamiento**, que se produce durante la etapa de **paquitene**. Es este intercambio físico de información genética entre regiones equivalentes de los cromosomas homólogos durante la fase de paquitene, la que cuenta en la recombinación genética. La etapa de paquitene está marcada por un dramático proceso de compactación que reduce cada cromosoma a menos de un cuarto de su longitud previa.

En la etapa de **diplotene**, los cromosomas homólogos de cada bivalente empiezan a separarse unos de otros, particularmente cerca del centrómero. Sin embargo, los dos cromosomas de cada pareja de homólogos se mantienen anclados por conexiones denominadas **quiasmas** (en singular: **quiasma**). Tales conexiones se sitúan en regiones donde los cromosomas homólogos han intercambiado segmentos de DNA y por tanto proporcionan una evidencia visual de que se ha producido el sobrecruzamiento entre las dos cromátidas, cada una derivada de un cromosoma.

En algunos organismos —las hembras de mamíferos, por ejemplo, los cromosomas se descondensan durante diplotene, la transcripción continúa, y las células «descansan» de la meiosis por un periodo prolongado de crecimiento, que a veces dura años—. (Consideraremos esta cuestión al final de nuestra discusión sobre la meiosis.) Con el inicio de la **diacinesis**, la etapa final de la profase I, los cromosomas se recondensan hasta su estado de máxima compactación. Ahora, los centrómeros de los cromosomas homólogos se separan más aún y finalmente, los quiasmas se mantienen como los únicos anclajes que quedan entre los

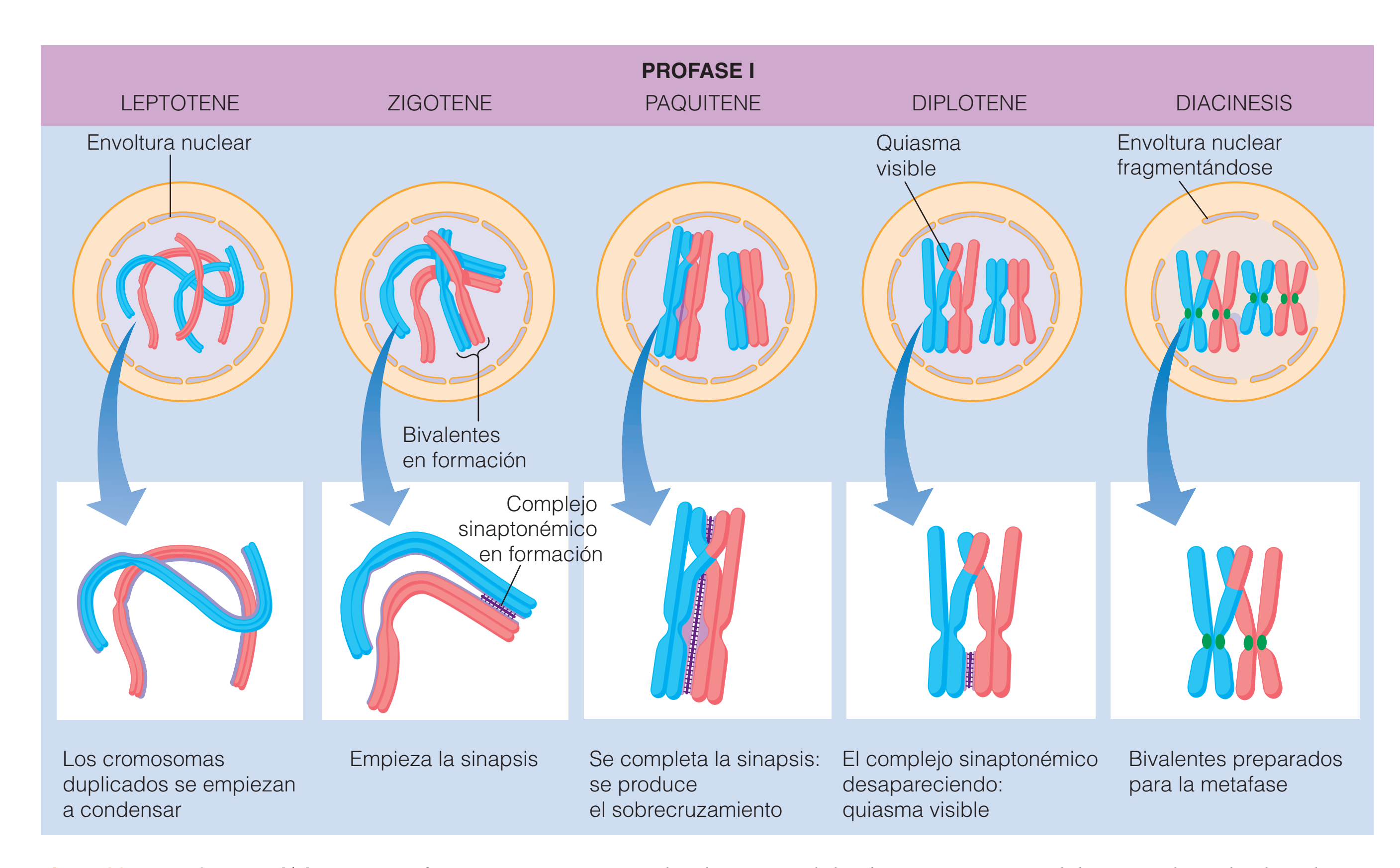


Figura 20.7 Profase I meiótica. La profase I es un proceso complicado que se subdivide en cinco etapas. El diagrama de arriba describe cada etapa del núcleo celular de una célula diploide con un total de cuatro cromosomas (dos pares de homólogos). Los diagramas de abajo se centran en una única pareja de homólogos en detalle, revelando la formación y posterior desaparición del complejo sinaptonémico, una estructura proteica que mantiene a los cromosomas homólogos en una estrecha aposición lateral durante la etapa de paquitene. El rojo y el azul distinguen los cromosomas paterno y materno de cada par de homólogos. El complejo sinaptonémico se muestra en tonos morados.

cromosomas homólogos. En este estadio, desaparecen los nucleolos, se forma el huso, y la envoltura nuclear se fragmenta, marcando el final de la profase I. Se ha descubierto que lo que mantiene sujetos a los cromosomas homólogos en estrecha aposición durante la sinapsis es el **complejo sinaptonémico**, una elaborada estructura proteica que nos recuerda a una cremallera (Figura 20.8). Los *elementos laterales* del complejo sinaptonémico, empiezan a unirse a los cromosomas individuales durante la etapa de leptotene, pero el *elemento central*, que es el que normalmente mantiene juntos a los cromosomas homólogos, no se forma hasta la etapa de zigotene (Figura 20.8b). ¿Cómo se reconocen los miembros de cada par de cromosomas homólogos, para que puedan unirse mediante el complejo sinaptonémico? Durante el inicio de la etapa de zigotene, los extremos (telómeros) de cada cromosoma se agrupan a un lado del núcleo y se fijan a la envoltura nuclear, con el cuerpo de cada cromosoma formando un bucle. Para comprenderlo, imagine que sujeta juntos, los extremos de cuatro cuerdas (dos largas y dos cortas). Si le da a las cuerdas una fuerte sacudida, las cuerdas inician cuatro bucles, ordenados de acuerdo a su longitud. Se cree que este tipo de configuración cromosómica, denominada *bouquet*, promueve el alineamiento de los cromosomas.

El alineamiento de cromosomas de tamaños similares facilita la formación de los complejos sinaptonémicos, que se desarrolla por completo durante la fase de paquitene. La formación de los complejos sinaptonémicos está estrechamente relacionada en eucariotas superiores con el proceso de sobrecruzamiento; algunas micrografías electrónicas revelan complejos proteicos adicionales, denominados *nódulos de recombinación*, que mediarían el proceso de sobrecruzamiento. Los complejos sinaptonémicos se desensamblan durante la etapa de diplotene, permitiendo que los cromosomas homólogos se separen (excepto cuando están unidos por los quiasmas).

Metafase I: los bivalentes se alinean en el ecuador del huso. Durante la metafase I, los bivalentes se anclan por medio de sus cinetocoros a los microtúbulos del huso y migran hacia el ecuador del huso. La presencia de cromosomas homólogos *emparejados* (es decir, bivalentes) en el ecuador del huso durante la metafase I es una diferencia crucial entre la meiosis I y una división mitótica típica, donde tal emparejamiento no se observa (Figura 20.9). Puesto que cada bivalente contiene cuatro cromátidas (dos cromátidas hermanas de cada cromosoma), también están presentes cuatro cinetocoros. Los cinetocoros de las cromátidas hermanas se encuentran uno al lado del otro —en muchas especies aparecen como una masa única— y están orientados hacia el mismo polo de la célula. Tal organización permite a los cinetocoros derivados de las cromátidas hermanas de uno de los cromosomas homólogos unirse a los microtúbulos que proceden de un polo del huso, y a los cinetocoros derivados

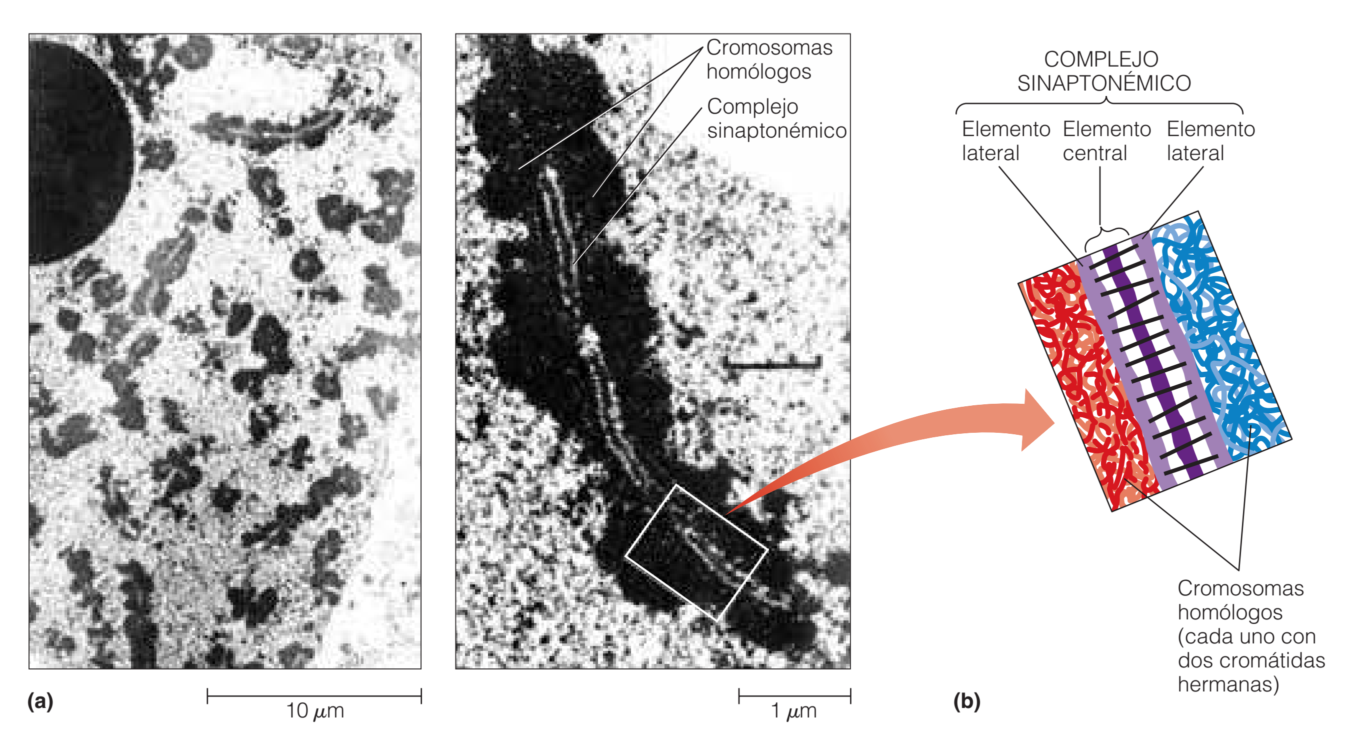
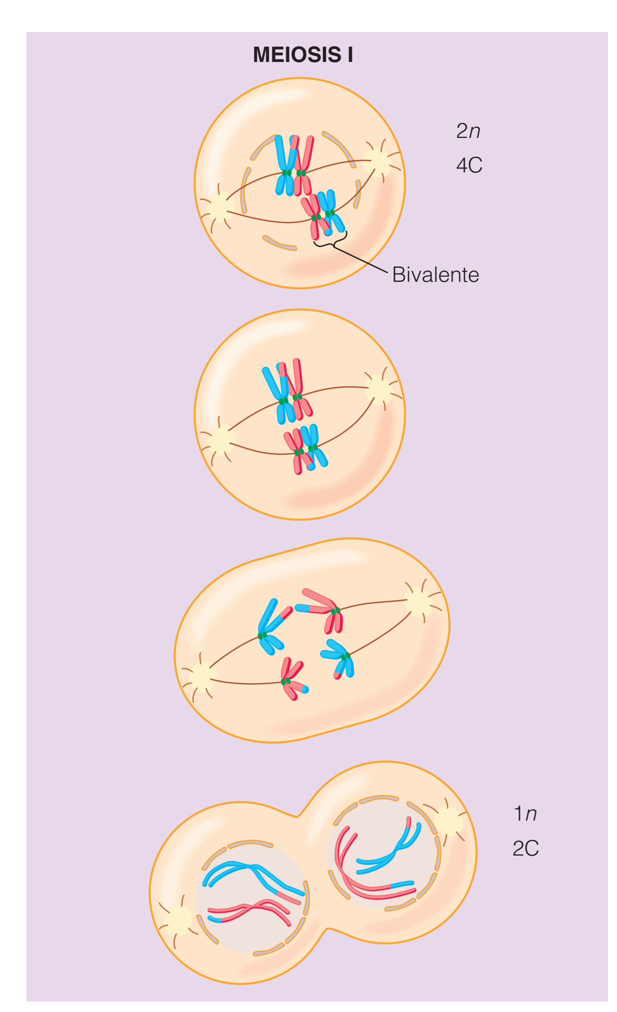


Figura 20.8 El complejo sinaptonémico. (**a**) Estas micrografías electrónicas muestran, a dos aumentos diferentes, complejos sinaptonémicos del núcleo de células de lirio. Las células están en la etapa de paquitene de la profase I. (**b**) El diagrama identifica los *elementos laterales* del complejo (morado claro), que parece que se forma en los cromosomas durante leptotene y su *elemento central* (o *axial*) (morado oscuro), que empieza a aparecer en zigotene y mantiene juntos «como con una cremallera» a los cromosomas homólogos. En paquitene, los homólogos se mantienen estrechamente unidos a lo largo de toda su longitud.



Profase

Cada cromosoma en condensación tiene dos cromátidas. En la meiosis I, los cromosomas homólogos forman la sinapsis, formando un bivalente. Se produce el sobrecruzamiento entre cromátidas no hermanas, produciendo los quiasmas. En la mitosis, cada cromosoma actúa independientemente.

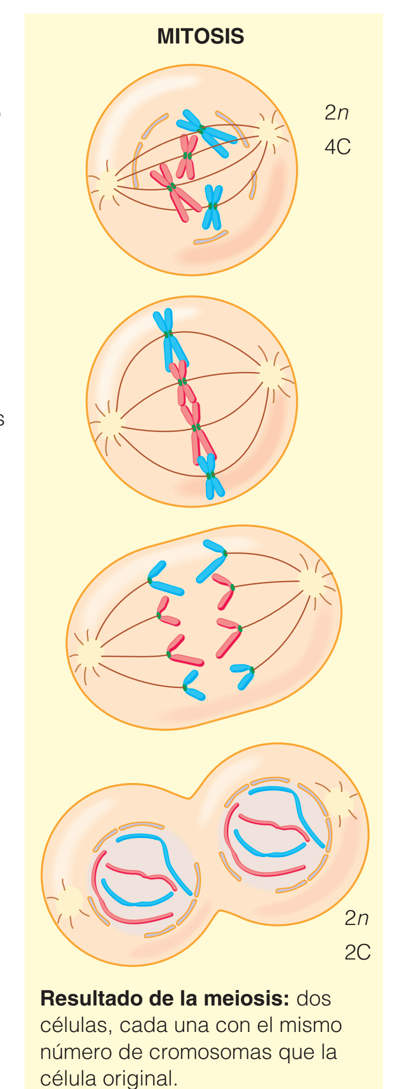
Metafase

En meiosis I, los bivalentes se alinean en la placa metafásica. En la mitosis, los cromosomas individuales se alinean en la placa metafásica.

Anafase

En la meiosis I, los cromosomas (no las cromátidas) se separan. En la mitosis, se separan las cromátidas.

Telofase y citocinesis



Resultado de la meiosis: dos células, cada una con el mismo número de cromosomas que la célula original.

MEIOSIS II

1n

1C

En la meiosis II, las cromátidas hermanas se separan.

Resultado de la meiosis: cuatro células haploides, cada una con la mitad del total de cromosomas de la célula original. Cada célula haploide contiene una mezcla al azar de cromosomas maternos y paternos.

Figura 20.9 **Meiosis y mitosis comparadas.** Tanto la meiosis como la mitosis van precedidas por la replicación del DNA, dando como resultado, en la profase, a dos cromátidas hermanas por cromosoma. La meiosis, que se produce sólo en las células sexuales, incluye dos divisiones nucleares (y celulares), dividiendo a la mitad el número de cromosomas y dejando una dotación haploide. Además, durante la elaborada profase de la primera división meiótica, los cromosomas homólogos forman la sinapsis y se produce el sobrecruzamiento entre cromátidas no hermanas. La mitosis implica sólo una única división, produciendo dos núcleos diploides (y normalmente, células también diploides), cada una con el mismo número de cromosomas de la célula original. En la mitosis, los cromosomas homólogos se comportan independientemente; en ningún momento se emparejan.

de las cromátidas hermanas del otro cromosoma homólogo unirse a los microtúbulos que proceden del polo opuesto del huso. Esta orientación dispone el escenario para la separación de los cromosomas homólogos durante la anafase. En este punto, los bivalentes se orientan al azar, en el sentido de que, por cada bivalente, o bien el homólogo materno, o bien el paterno estarán orientados hacia un polo concreto de la célula. El resultado es que cada polo del huso (y por tanto, cada célula hija) recibirá una mezcla al azar de cromosomas paternos y maternos cuando los dos miembros de cada pareja de cromosomas se muevan hacia los polos opuestos del huso durante la anafase.

En esta etapa, los cromosomas homólogos se mantienen juntos exclusivamente por los quiasmas. Si por alguna razón, la profase I hubiese ocurrido sin sobrecruzamientos, y por tanto sin la formación de quiasmas, los cromosomas podrían no estar emparejados correctamente en el ecuador del huso y los cromosomas homólogos podrían no separarse apropiadamente durante la anafase I. Esto es exactamente lo que sucede durante la meiosis, en las células de levaduras mutantes que muestran deficiencias de recombinación genética defectuosas.

Anafase I: los cromosomas homólogos se mueven hacia polos opuestos del huso. Al principio de la anafase I, los miembros de cada pareja de cromosomas homólogos se separan unos de otros y empiezan a migrar hacia los polos opuestos del huso, empujados por sus respectivos microtúbulos cinetocóricos. Fíjese otra vez en las diferencias fundamentales entre meiosis y mitosis (Figura 20.9). Durante la anafase mitótica, las *cromátidas hermanas* se separan y se mueven hacia polos opuestos del huso, mientras que en la anafase I de la meiosis, *cromosomas homólogos* se separan y se mueven hacia polos opuestos del huso, mientras que las cromátidas hermanas permanecen juntas. Puesto que los dos miembros de cada par de cromosomas homólogos se mueven hacia polos opuestos del huso durante la anafase I, cada polo recibe un juego haploide de cromosomas.

¿Cómo se puede explicar el hecho de que las cromátidas hermanas se separen unas de otras durante la mitosis pero no durante la meiosis I? En el Capítulo 19, vimos que la anafase mitótica está asociada con la activación de la enzima separasa por el complejo promotor de la anafase (*véase* Figura 19.37); la separasa activada, a cambio, rompe las cohesinas que mantienen unida a las cromátidas hermanas, permitiendo de esta forma que las cromátidas hermanas se separen. Para impedir que la separación de las cromátidas hermanas se produzca en la anafase I de la meiosis, las células producen una proteína específica de la meiosis, denominada *shugoshina*, que protege a las cohesinas localizadas en el centrómero de los cromosomas de ser degradado por la separasa.

Telofase I y citocinesis: se producen dos células haploides. El inicio de la telofase I viene marcado por la llegada de un juego haploide de cromosomas a cada polo del huso. El miembro de la pareja de homólogos que termina por llegar a cada polo se determina enteramente por cómo los cromosomas se orientan en el ecuador del huso durante la metafase I. A veces, después de que los cromosomas hayan llegado a los polos del huso, y antes de que empiece la citocinesis, se forma la envoltura nuclear alrededor de éstos, generando dos células haploides cuyos cromosomas consisten en cromátidas hermanas. En la mayoría de los casos, los cromosomas no se descondensan antes de que empiece la meiosis II.

La meiosis II se parece a una división mitótica

Después de que se completa la meiosis I puede producirse una interfase corta antes de que empiece la **meiosis II**. Sin embargo, esta interfase no va acompañada de una replicación del DNA puesto que cada cromosoma *y* consta de una pareja de cromátidas hermanas replicadas que se habían generado durante la interfase que precedió a la meiosis I. *De manera que el DNA sólo se replica una vez, y esto es antes de la primera división meiótica.* El propósito de la meiosis II, como el de una división mitótica es repartir las cromátidas hermanas, creadas en la primera vuelta de replicación de DNA en dos nuevas células recién formadas. El resultado es que nos referimos en ocasiones a la meiosis II como a la *división de separación* de la meiosis.

La profase II es muy corta. Si se detecta, es muy parecida a la profase de una mitosis. La metafase II también se parece a la etapa equivalente de la mitosis, excepto en que sólo la mitad del total de los cromosomas está presente en el ecuador del huso. Los cinetocoros de las cromátidas hermanas ahora están orientados en direcciones opuestas, permitiendo que las cromátidas hermanas se separen y se muevan (como nuevos cromosomas hijos) hacia polos opuestos del huso durante la anafase II. Las fases restantes de la segunda división meiótica se parecen a las etapas equivalentes de la mitosis. El resultado final es la formación de cuatro células hijas, cada una conteniendo un juego haploide de cromosomas. Puesto que los dos miembros de cada pareja de cromosomas homólogos se distribuyeron al azar entre las dos células producidas en la meiosis I, cada una de las células hijas haploides producidas en la meiosis II contiene una mezcla al azar de cromosomas maternos y paternos. Además, cada uno de estos cromosomas está compuesto por una mezcla de secuencias de DNA materno y paterno formados por el sobrecruzamiento realizado durante la profase I.

Normalmente, mientras que cada una de las células producidas en la meiosis contiene un juego haploide y completo de cromosomas, un error raro, denominado **no disyunción** puede producir células a las que o bien les falta un cromosoma en particular o bien contienen un cromosoma extra. La no disyunción hace referencia a un error en la separación o bien de cromosomas homólogos (durante la

anafase I) o bien de cromátidas hermanas (durante la anafase II) durante la transición metafase-anafase. En lugar de separarse, tanto los cromosomas como las cromátidas se mantendrían unidas y se moverían a una de las células hijas, generando por tanto, una célula que contendría las dos copias del cromosoma y otra célula que no contendría ninguna copia. Los gametos resultantes tendrían un número incorrecto de cromosomas y tenderían a producir embriones defectuosos que morirían antes del nacimiento. Sin embargo, unos pocos de estos gametos pueden participar en la formación de embriones que sobreviven. Por ejemplo, si un espermatozoide humano anormal que contiene dos copias del cromosoma 21, fertiliza a un óvulo normal que contiene una copia del cromosoma 21, el embrión resultante que posee tres copias del cromosoma 21 puede desarrollarse por completo y conduciría al nacimiento de un niño vivo. Pero este niño, mostraría una serie de anormalidades en su desarrollo —incluyendo baja estatura, manos grandes, pliegues sobre los ojos e inteligencia disminuida—, lo que en su conjunto constituye el *síndrome de Down*.

En este punto, usted puede estudiar la Figura 20.9 en su conjunto, para revisar las similitudes y diferencias entre la meiosis y la mitosis. En este diagrama, la cantidad de DNA presente en las diferentes etapas se indica usando el **valor C**, que corresponde a la cantidad de DNA presente en un solo (haploide) juego de cromosomas. En una célula diploide anterior a la fase S, el número de cromosomas es de $2n$ y el contenido en DNA es de 2C ya que los dos juegos de cromosomas están presentes. Cuando el DNA se replica durante la fase S, el contenido en DNA se duplica a 4C ya que ahora cada cromosoma contiene dos cromátidas. En la meiosis I, la segregación de los cromosomas homólogos en células hijas diferentes reduce el número de cromosomas de $2n$ a $1n$ y el contenido de DNA de 4C a 2C. La separación de cromátidas hermanas durante la meiosis II reduce el contenido de DNA de 2C a 1C mientras que el número de cromosomas se mantiene en $1n$. Por el contrario, una mitosis normal reduce el contenido de DNA de 4C a 2C (por la separación de cromátidas hermanas) mientras que el número de cromosomas se mantiene en $2n$.

Los espermatozoides y los óvulos se generan por meiosis acompañada de diferenciación celular

La meiosis subyace en el centro de la gametogénesis, que como hemos visto anteriormente, es el proceso de formación de gametos haploides a partir de células precursoras diploides. Pero los gametos masculinos y femeninos difieren significativamente en estructura, lo que significa que la gametogénesis debe consistir en algo más que en la meiosis. La Figura 20.10 es una descripción esquemática de la gametogénesis en los animales. En los varones, la meiosis convierte un espermatocito diploide en cuatro espermátidas haploides de tamaño similar (Figura 20.10a). Después de que se haya completado la meiosis, las espermátidas se diferencian en espermatozoides eliminando la mayoría de su citoplasma y desarrollando un flagelo y otras estructuras especializadas.

En las mujeres, la meiosis convierte un *oocito* diploide en cuatro células haploides, pero sólo una de las cuatro sobrevive y da lugar a un óvulo funcional (Figura 20.10b). Este resultado se genera por dos divisiones meióticas que dividen el citoplasma del oocito de manera desigual, ya que una de las cuatro células hijas recibe el grueso del citoplasma del oocito diploide original. Las otras tres células más pequeñas, denominadas **corpúsculos polares**, degeneran. La ventaja de que sólo uno de los cuatro productos haploides de la meiosis se desarrolle en un óvulo funcional es que el citoplasma, que de otra forma se habría distribuido entre cuatro células, se concentra en un único óvulo, maximizando el contenido de nutrientes almacenados en cada óvulo.

Una diferencia importante entre la formación del óvulo y del espermatozoide, radica en la etapa en la que en la que la célula adquiere las características especializadas que les convierten en gametos maduros funcionalmente. Durante el desarrollo de los espermatozoides, la meiosis crea espermátidas que deben eliminar la mayoría de su citoplasma y desarrollar un flagelo antes de ser maduras funcionalmente. Por el contrario, los óvulos en desarrollo, adquieren sus características especializadas, *durante* el proceso de la meiosis. Muchas de las características especiales del óvulo se adquieren durante la profase I, que es cuando la meiosis se detiene temporalmente para dar tiempo a un crecimiento celular más extenso. Durante esta *fase de crecimiento*, la célula desarrolla varios tipos de cubiertas externas diseñadas para proteger al óvulo de los daños físicos y químicos. La cantidad de crecimiento que tiene lugar durante esta fase puede ser considerable. Un óvulo humano, por ejemplo, tiene un diámetro de aproximadamente 100 μm, lo que le proporciona un volumen más de cien veces superior al del oocito diploide a partir del cual se origina. Considere el tamaño gigante de ¡un huevo de pájaro!

Después de que la fase de crecimiento se haya completado, los oocitos en desarrollo quedan detenidos en profase I hasta que la meiosis se reanuda por un estímulo apropiado. En los anfibios, la reanudación de la meiosis se dispara por la hormona esteroide progesterona, cuya presencia conduce a un aumento de actividad de la proteína quinasa, *MPF*. En el Capítulo 19, aprendimos que el MPF es un complejo cdK-ciclina que controla la división celular por mitosis disparando el paso de la fase G2 a la fase M. El MPF también controla la meiosis disparando la transición de la profase I a la metafase I. La progesterona ejerce su control sobre el MPF estimulando la producción de *Mos*, una proteína quinasa que activa una serie de proteínas quinasas que a cambio conducen a la activación del MPF.

En respuesta a la activación de MPF, se completa la primera división meiótica. En algunos organismos, la segunda división meiótica continúa rápidamente hasta que se completa; en otros, se detiene en un estado intermedio y no

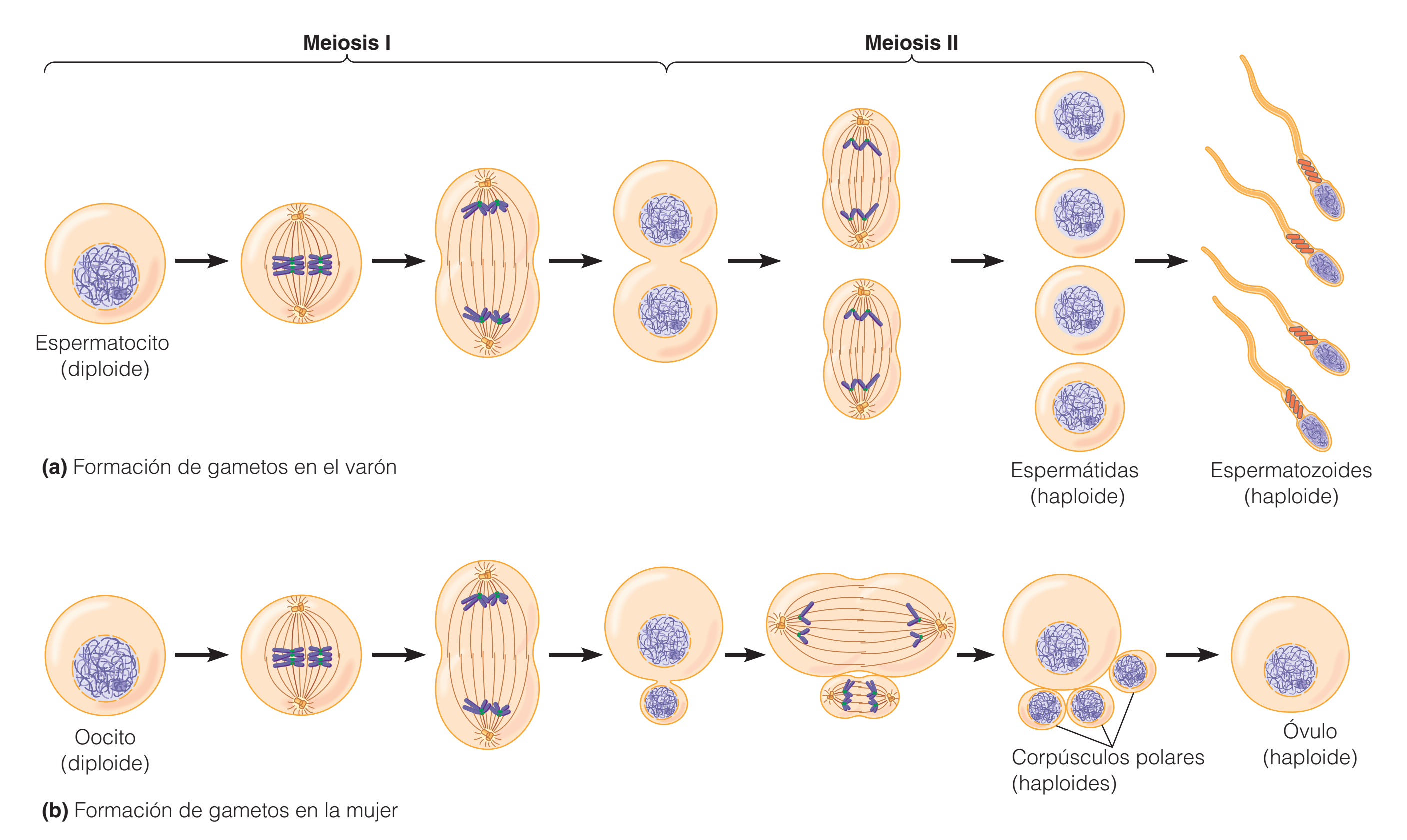


Figura 20.10 Formación de gametos. (**a**) En el varón, los cuatro productos haploides de la meiosis se retienen y se diferencian en espermatozoides. (**b**) En la mujer, las divisiones meióticas son asimétricas, formando un óvulo grande y tres (en algunos casos, sólo dos) células pequeñas denominadas corpúsculos polares que no dan lugar a gametos funcionales. Aunque no se indica aquí, normalmente, la célula huevo madura ha crecido mucho más que el oocito a partir del que surge.

se completa hasta después de la fertilización. En los óvulos de vertebrados, por ejemplo, la segunda división meiótica generalmente se detiene en metafase II hasta que la fertilización tiene lugar. La molécula responsable de desencadenar la detención en metafase II es *Mos*, la misma proteína quinasa que regula la transición de profase I a metafase I.

En el momento en que la meiosis se completa, el óvulo está completamente «maduro» y puede incluso haber sido fertilizado. El óvulo maduro es una célula altamente diferenciada que se especializa en la tarea de producir un nuevo organismo, en el mismo sentido que una célula muscular se especializa en la contracción o un glóbulo rojo se especializa en transportar oxígeno. Esta especialización inherente del óvulo se demuestra mediante la observación de que, incluso en ausencia de fertilización por el espermatozoide, muchas clases de óvulos animales se pueden estimular para que desarrollen un embrión completo por tratamientos artificiales tan simples como un alfilerazo. Por tanto, todo lo necesario para programar las primeras etapas del desarrollo debe estar ya presente en el óvulo.

Normalmente esta secuencia del desarrollo se activa por interacciones entre el espermatozoide y el óvulo, que implican características especializadas de la estructura del espermatozoide y del óvulo. En el espermatozoide animal, las enzimas liberadas por un saco rodeado de membrana llamado *acrosoma* situado en el extremo anterior del espermatozoide, disuelven las capas externas del óvulo y las proteínas específicas de especie de la superficie del espermatozoide, se unen a receptores del óvulo. Tras la fusión de las membranas plasmáticas del espermatozoide y del óvulo, el núcleo del espermatozoide penetra en el óvulo y se fusiona con el núcleo del óvulo, formándose así una célula diploide, el zigoto. La unión con el espermatozoide desencadena importantes cambios bioquímicos en el óvulo. Por ejemplo, el óvulo fertilizado desarrolla rápidamente una barrera contra la entrada de espermatozoides adicionales y simultáneamente sufre una tremenda explosión de actividad metabólica para preparar el desarrollo embrionario. Aunque no se describe aquí, la fertilización en las plantas implica acontecimientos celulares y bioquímicos igualmente complejos.

La meiosis genera diversidad genética

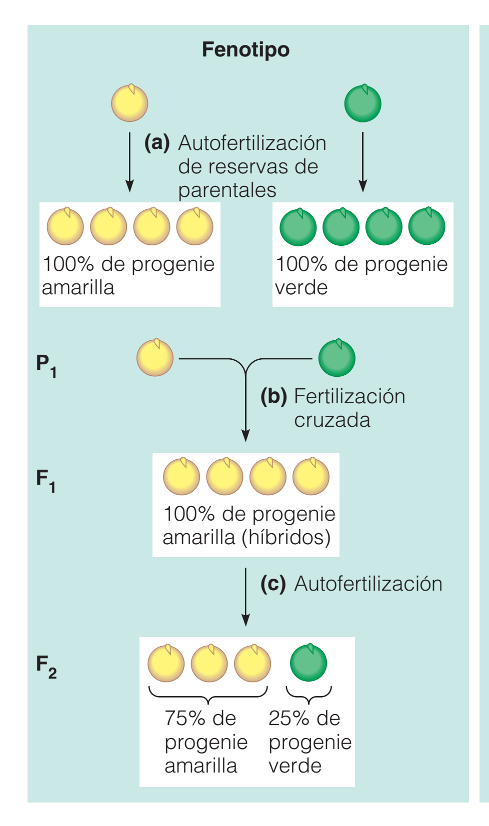
Como hemos indicado, una de las principales funciones de la meiosis es preservar el número de cromosomas en los organismos que se reproducen sexualmente. De no ser por la meiosis los gametos tendrían tantos cromosomas como

cualquier otra célula del cuerpo y el número de cromosomas se duplicaría cada vez que los gametos se fusionasen para formar un nuevo organismo.

Sin embargo, el papel que desempeña la meiosis en la generación de diversidad genética en las poblaciones que se reproducen sexualmente, es igual de importante. La meiosis es el punto en el flujo de la información genética donde varias combinaciones de cromosomas (y los alelos que transportan) se reúnen en los gametos para su posible transferencia a la descendencia. Aunque cada gameto es haploide y posee, por tanto, un miembro de cada par de cromosomas homólogos, la combinación particular de cromosomas paternos y maternos en un gameto dado es aleatoria. Esta aleatoriedad se genera por la orientación al azar en la metafase I, donde los homólogos paternos y maternos de cada par pueden orientarse hacia cualquier polo, independientemente de las orientaciones de los otros bivalentes. En consecuencia, en los gametos humanos, que contienen 23 cromosomas, son posibles más de 8 millones de combinaciones diferentes de cromosomas maternos y paternos. Además, el sobrecruzamiento que tiene lugar entre los cromosomas homólogos durante la profase I genera una diversidad genética adicional entre los gametos. Al permitir el intercambio de segmentos de DNA entre cromosomas homólogos, el sobrecruzamiento genera más combinaciones de alelos que los que crearía por sí mismo el reparto aleatorio de los cromosomas maternos y paternos. Volveremos al sobrecruzamiento (recombinación) más adelante en este capítulo. Antes, sin embargo, veremos los experimentos históricos que revelaron las consecuencias genéticas de la segregación y reparto aleatorio de los cromosomas durante la meiosis. Estos experimentos fueron realizados por Gregor Mendel antes incluso de conocerse la existencia de los cromosomas.

Variabilidad genética: segregación y distribución de los alelos

La mayoría de los estudiantes de biología han oído hablar de Gregor Mendel y de los experimentos de genética clásica que realizó en el jardín de un monasterio. Los descubrimientos de Mendel, publicados por primera vez en 1865, pusieron las bases para lo que ahora conocemos como *Genética Mendeliana*. Trabajando con las plantas del guisante común de jardín, Mendel escogió siete caracteres fácilmente identificables de la planta del guisante y seleccionó en cada caso dos variedades de plantas que exhibían formas diferentes del carácter. Por ejemplo, el color de la semilla fue uno de los caracteres que eligió Mendel ya que tenía una línea de guisantes con semillas amarillas y otra con semillas verdes (*véase* Figura 20.1). Primero estableció que las líneas de plantas eran **líneas puras** mediante auto-fertilización, lo que significa que las plantas que crecían a partir de semillas amarillas producían sólo semillas amarillas, y las plantas que crecían de semillas verdes producían sólo semillas verdes (Figura 20.11a). Una vez establecido esto, Mendel estaba listo para investigar los principios que gobiernan la herencia de tales caracteres.



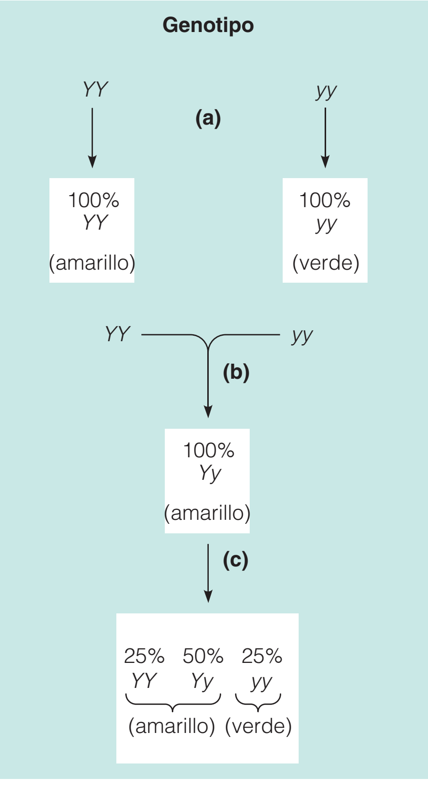


Figura 20.11 Análisis genético del color de la semilla en las plantas del guisante. Los cruzamientos genéticos se realizaron empezando con dos líneas puras de plantas de guisante, una con semillas amarillas y otra con semillas verdes. El carácter semilla amarilla es dominante (alelo *Y*); el carácter semilla verde es recesivo (alelo *y*). Los fenotipos resultantes de la progenie se muestran a la izquierda y los genotipos a la derecha. (Los genotipos se dedujeron posteriormente.) (**a**) Las reservas de los parentales son homocigotos o para el carácter dominante (*YY*) o para el carácter recesivo (*yy*) y se comprueba que son líneas puros por autofertilización. (**b**) Cuando se cruzaron las reservas de los parentales dieron lugar a plantas F_1 (híbridos) que eran todos heterocigotos (*Yy*) y que además mostraban el carácter dominante. (**c**) Tras la autofertilización, las plantas de la F_1 produjeron, en la generación F_2, semillas amarillas y verdes en una proporción 3:1. *Véanse* Figuras 20.12 y 20.13 para análisis en detalle.

La información que especifica caracteres recesivos puede estar presente sin expresarse

En su primer grupo de experimentos, Mendel cruzó las plantas parentales puras (la **generación P_1**) para producir líneas **híbridas**. El resultado de este experimento debió parecer misterioso al principio: en cada caso, la descendencia resultante —llamada **generación F_1**— mostraba uno u otro de los caracteres parentales, pero nunca ambos. En otras palabras, uno de los caracteres parentales era siempre dominante y el otro era siempre recesivo. En el caso del color de la semilla, por ejemplo, todas las plantas F_1 tenían semillas amarillas (Figura 20.11b), lo que indica que el color amarillo de la semilla es dominante.

Durante el siguiente verano, Mendel dejó autofecundarse todos los híbridos F_1. Hizo la misma sorprendente observación para cada uno de los siete caracteres estudiados: el carácter recesivo que parecía haber desaparecido en la generación F_1 reaparecía entre la progenie de la siguiente generación, la **generación F_2**. Además, para cada uno de los siete caracteres, la relación entre los fenotipos dominante y recesivo era siempre aproximadamente 3:1. Por ejemplo, en el caso del color de la semilla de las plantas que crecieron a partir de las semillas amarillas de la generación F_1, aproximadamente el 75% produjo semillas amarillas y el 25% semillas verdes (Figura 20.11c).

Este resultado era bastante diferente del comportamiento de las semillas amarillas puras de la línea parental, que sólo había producido semillas amarillas al autofecundarse. Claramente había una diferencia importante entre las semillas de la generación P_1 y las semillas amarillas de la generación F_1. Parecían iguales, pero aquéllas eran líneas puras y éstas no.

A continuación, Mendel investigó las plantas F_2 por autofecundación (Figura 20.12). Las plantas F_2 que mostraban el carácter recesivo (verde en el caso del color de la semilla) eran siempre líneas puras (Figura 20.12c), lo que sugería que eran genéticamente idénticas a la línea P_1 de semillas verdes con la que Mendel había empezado. Las plantas F_2 con el carácter dominante produjeron, sin embargo, un patrón más complejo. Un tercio eran líneas puras para el carácter dominante (Figura 20.12a) y por tanto parecían ser idénticas, a las plantas P_1 con el carácter dominante (semilla amarilla). Sin embargo, los otros dos tercios de las plantas que en la F_2 tenían semillas amarillas produjeron una descendencia con fenotipos tanto dominantes como recesivos en una relación 3:1 (Figura 20.12b), la misma relación que había aparecido por la autofecundación de F_1.

Estos resultados llevaron a Mendel a la conclusión de que la información genética que especifica el carácter recesivo debe estar presente en las plantas y semillas híbridas F_1 incluso a pesar de que el carácter no se expresa. Esta conclusión era consistente con los resultados de otro grupo de experimentos, en los que los híbridos F_1 se cruzaron con las líneas parentales originales, técnica denominada **retrocruzamiento** (Figura 20.13). El retrocruzamiento de los híbridos F_1 con la línea parental dominante, siempre producía una descendencia que expresaba el carácter dominante (Figura 20.13a), mientras que el retrocruzamiento con la línea parental recesiva producía una mezcla de plantas que expresaban caracteres dominantes y recesivos en una proporción 1:1 (Figura 20.13b). Además, la progenie dominante procedente de este último cruzamiento se comportaba exactamente igual que los híbridos F_1: tras la autofecundación daban lugar a una mezcla de fenotipos

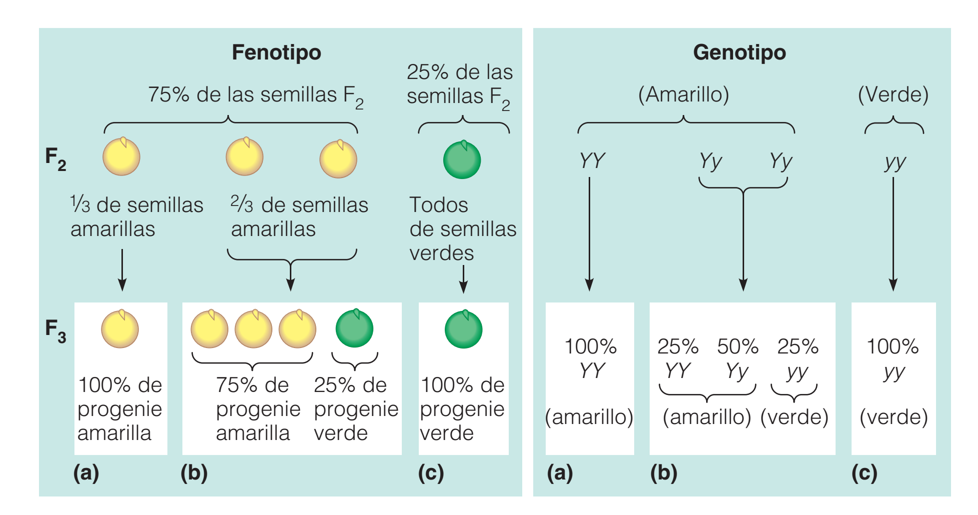


Figura 20.12 **Análisis de la F_2 de las plantas del guisante por autofertilización.** Las plantas de la F_2 de la Figura 20.11 fueron analizadas por autofertilización. Los resultados fenotípicos se muestran a la izquierda y los genotípicos (deducidos posteriormente) a la derecha. (**a**) Un tercio de la progenie F_2 amarilla de la Figura 20.11 (25% del total de la progenie F_2) resultó línea pura para el color amarillo de la semilla tras autofertilización, puesto que eran genotípicamente (*YY*). (**b**) Dos tercios de la progenie F_2 amarilla (50% del total de la progenie F_2) dio lugar a semillas amarillas y verdes tras autofertilización, en una proporción de 3:1 (al igual que hicieron las plantas de la F_2 de la Figura 20.11 tras autofertilización). (**c**) Todas las semillas verdes de la F_2 (25% del total de la progenie F_2) resultaron línea pura para el color verde de la semilla tras autofertilización, puesto que eran genotípicamente (*yy*).

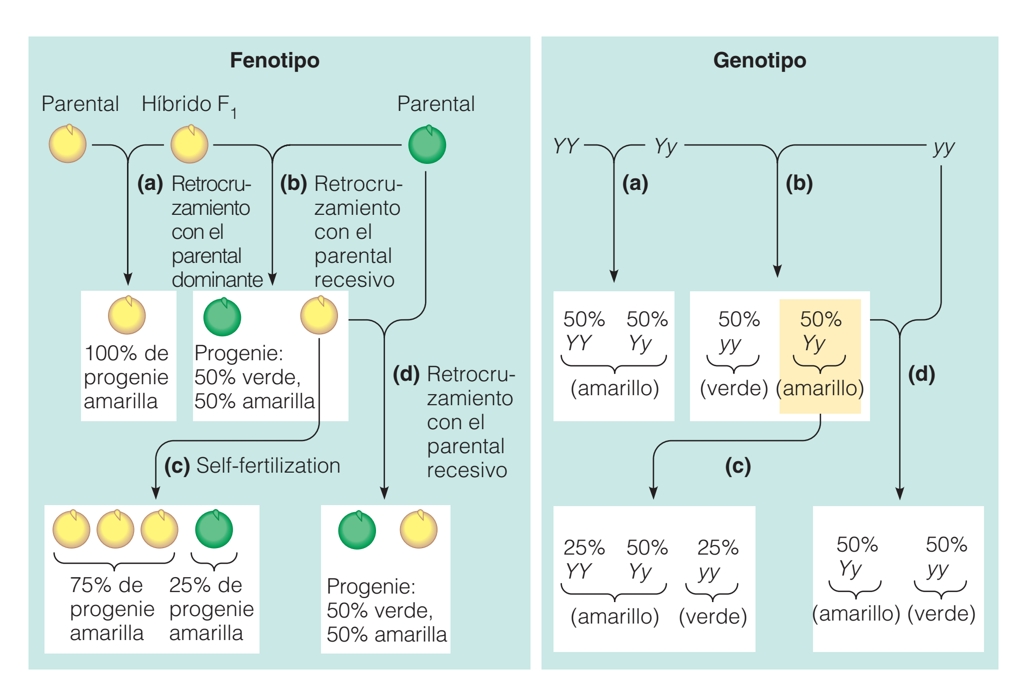


Figura 20.13 **Análisis de los híbridos de la F_1 por retrocruzamiento (cruzamiento prueba).** Los híbridos de la F_1 de la Figura 20.11 se analizaron por retrocruzamiento con las líneas parentales (P_1). Los resultados fenotípicos se muestran a la izquierda y los genotípicos (deducidos posteriormente) a la derecha. **(a)** Tras retrocruzamiento de los híbridos (*Yy*) de la F_1 con el parental dominante (*YY*), toda la progenie tiene semillas amarillas, ya que el genotipo es *YY* o *Yy*. **(b)** El retrocruzamiento con el parental recesivo (*yy*), da lugar a semillas amarillas (*Yy*) o verdes (*yy*) en igual proporción. **(c)** Esta progenie de semillas amarillas dará lugar tras autofertilización, a una mezcla 3:1 de semillas amarillas y verdes (justo como con los híbridos de la F_1 en la Figura 20.11). **(d)** El retrocruzamiento de la progenie de semillas amarillas con el parental homocigoto recesivo da lugar otra vez a una mezcla 1:1 de semillas amarillas y verdes, como en el retrocruzamiento del apartado b.

con una proporción 3:1 (Figura 20.13c) y tras retrocruzamiento con la línea parental recesiva, producían una progenie dominante o recesiva en una proporción 1:1 (Figura 20.13d). (Al final del capítulo, en el Problema 20.7, se muestra una forma alternativa de esquematizar los cruces, llamada *cuadro de Punnett.*)

La ley de la segregación establece que los alelos de cada gen se separan durante la formación de los gametos

Después de una década de meticulosos trabajos para documentar los patrones de herencia precedentes, Mendel formuló varios principios —conocidos en la actualidad como las **Leyes de la Herencia de Mendel**—, que explicaban los resultados que había observado. El primero de estos principios era que los caracteres fenotípicos vienen determinados por «factores» discretos que están presentes en la mayoría de los organismos como pares de «determinantes». Hoy denominamos a esos «factores», *genes,* y a los «determinantes», *alelos* (formas alternativas de los genes). Las conclusiones de Mendel parecen casi absolutamente evidentes para nosotros, pero fue una afirmación importante en su día. En esa época, la mayoría de los científicos estaban a favor de la *teoría de la herencia de mezcla*, una teoría que visionaba los caracteres como el color de la semilla verde o amarillo como latas de pintura que se derraman juntas para dar lugar a resultados intermedios. Otros investigadores habían descrito antes que Mendel la naturaleza de la herencia de no mezcla, pero sin los datos ni el análisis matemático que acompañaba a la especial aportación de Mendel. El avance de Mendel es especialmente impresionante cuando recordamos que formuló su teoría antes de que nadie hubiera visto los cromosomas.

De especial importancia para el desarrollo de la genética son las conclusiones de Mendel con respecto a la forma en la que los genes se reparten durante la formación de los gametos. De acuerdo a su ley de la segregación, los dos alelos de un gen son entidades diferentes que se segregan, o separan una de otra, durante la formación de los gametos. En otras palabras, los dos alelos retienen sus identidades incluso cuando ambos están presentes en un organismo híbrido, y se reparten en gametos separados de forma que pueden surgir sin cambios en generaciones posteriores.

La ley de la segregación independiente establece que los alelos de cada gen se separan de manera independiente de los alelos de otros genes

Además de los cruzamientos ya descritos, cada uno de los cuales centrado en un único par de alelos, Mendel también estudió cruzamientos *multifactor* entre plantas que diferían en *varios* caracteres. Además de diferir en el color de la se-

milla, por ejemplo, las plantas que cruzaba podían diferir en la forma de la semilla y en la posición de las flores. Como en los cruzamientos de factor único, él utilizaba plantas parentales que eran líneas puras (homocigotas) para los caracteres que estaba probando y generaba en la generación F_1 híbridos heterocigotos para cada carácter. Entonces, autofertilizaba estos híbridos y determinaba la frecuencia con la cual aparecían las formas dominantes y recesivas de los diferentes caracteres entre la progenie.

Mendel descubrió que en la progenie F_2 aparecían todas las combinaciones posibles de caracteres, y concluyó que entre los gametos de la F_1 deberían, por tanto, estar presentes todas las combinaciones posibles de los diferentes alelos. Además, a partir de las proporciones en las que se encontraban los distintos fenotipos en la generación F_2, Mendel dedujo que en los gametos se producen con igual frecuencia todas las combinaciones posibles de alelos. En otras palabras, *los dos alelos de cada gen se segregan de manera independiente de los alelos de otros genes*. Ésta es la **ley de la segregación independiente**, otra piedra angular de la genética. (Más tarde se demostraría que esta ley sólo se aplica a los genes que se encuentran en diferentes cromosomas o en el mismo cromosoma pero lo suficientemente alejados entre sí.)

Las primeras evidencias al microscopio sugieren que los cromosomas podrían portar información genética

Los descubrimientos de Mendel se quedaron aletargados en la literatura científica hasta 1900, cuando su artículo se descubrió casi simultáneamente por otros tres biólogos europeos. Mientras tanto, se había aprendido mucho al respecto de las bases celulares de la herencia. En 1875, por ejemplo, los microscopistas habían identificado los cromosomas con la ayuda de colorantes producidos por la floreciente industria de la tinción con anilinas. Casi al mismo tiempo, se demostró que la fertilización implicaba la fusión de los núcleos del espermatozoide y del óvulo, sugiriendo que los núcleos portaban la información genética.

La primera sugerencia de que los cromosomas podrían ser los que portan la información genética, se realizó en 1883. En diez años, se estudian los cromosomas en células en división y se observó que éstos se escindían longitudinalmente en dos cromosomas hijos aparentemente idénticos. Esto les hizo darse cuenta de que el número de cromosomas por célula se mantiene constante durante el desarrollo de un organismo. Con la invención de mejores sistemas ópticos, fue posible un análisis más detallado de los cromosomas. Se demostró que la división celular por mitosis implicaba el movimiento de los cromosomas hijos idénticos hacia polos opuestos, asegurando por esta razón que las células hijas tendrían exactamente la misma dotación cromosómica que sus células parentales.

A este escenario, se sumó el redescubrimiento del artículo de Mendel, seguido casi inmediatamente por tres estudios cruciales que determinaban que los cromosomas eran los portadores de los factores de Mendel. Los investigadores eran Edward Montgomery, Theodor Boveri y Walter Sutton. La contribución de Montgomery fue reconocer la existencia de cromosomas homólogos. A partir de las cuidadosas observaciones realizadas en los cromosomas de insectos, concluyó que los cromosomas de la mayoría de las células se agrupaban en parejas, con un miembro de la pareja de origen materno y el otro de origen paterno. También apuntó que los dos cromosomas de cada tipo se mantenían juntos en la sinapsis de la «división reduccional» (ahora denominada meiosis I) de la formación de los gametos, un proceso que se había descrito, más o menos, una década antes.

Entonces Boveri añadió la observación crucial de que cada cromosoma desempeña un papel genético único. Esta idea procede de estudios en los que huevos de erizo de mar se fertilizan en presencia de un exceso de espermatozoides, provocando que algunos óvulos, sean fertilizados por dos espermatozoides. La presencia de dos núcleos de espermatozoide en un único óvulo, condujo a la formación de un huso mitótico anormal que no distribuía a los cromosomas equitativamente en las células embrionarias recién formadas. Los embriones resultantes mostraban varios tipos de defectos durante el desarrollo, dependiendo de qué cromosoma en particular les faltase. Boveri, concluyó, por lo tanto, que cada cromosoma desempeña un papel único en el desarrollo.

Sutton, mientras tanto, estaba estudiando la meiosis en el saltamontes. En 1902, hizo la importante observación de que la orientación de cada par de cromosomas homólogos (bivalentes) en el ecuador del huso durante la metafase I, es puramente una cuestión de suerte. En otras palabras, cualquier par de homólogos, puede encontrarse con el cromosoma materno o paterno hacia cualquier polo, independientemente de la posición de las otras parejas. Por tanto, en los gametos producidos por un individuo dado, son posibles muchas combinaciones diferentes de cromosomas maternos y paternos (fíjese en la similitud con las observaciones de Mendel en las que en los gametos de la generación F_1 están presentes todas las combinaciones posibles de alelos diferentes).

El comportamiento de los cromosomas explica las leyes de la segregación y de la distribución independiente

Durante 1902-1903, Sutton reunió las observaciones previas en una teoría coherente que describía el papel de los cromosomas en la herencia. Esta *teoría cromosómica de la herencia* se resume en cinco puntos principales:

1. Los núcleos de todas las células excepto aquéllas de la línea germinal (espermatozoides y óvulos) contienen dos juegos de cromosomas homólogos, un juego de origen materno y otro de origen paterno.
2. Los cromosomas mantienen su individualidad y son genéticamente continuos a lo largo del ciclo vital de un organismo.

3. Los dos juegos de cromosomas homólogos en una célula diploide son equivalentes funcionalmente, cada uno porta un juego de genes similar.
4. Los homólogos materno y paterno forman la sinapsis durante la meiosis y se mueven a polos opuestos del huso de división segregándose por esta razón en células diferentes.
5. Los miembros maternos y paternos de los diferentes pares de homólogos se segregan independientemente durante la meiosis.

La teoría cromosómica de la herencia proporciona las bases físicas para la comprensión de cómo se pueden portar, transmitir y segregar los factores genéticos de Mendel. Por ejemplo, la presencia de dos juegos de cromosomas homólogos en cada célula discurre en paralelo con la sugerencia de Mendel de la existencia de dos determinantes para cada carácter fenotípico. Igualmente, la segregación de cromosomas homólogos durante las divisiones meióticas de la formación de gametos, proporciona una explicación para la ley de la segregación de Mendel, y la orientación aleatoria de los pares de homólogos en metafase I es importante para su ley de la segregación independiente.

Las Figuras 20.14 y 20.15 ilustran las bases cromosómicas de las leyes de Mendel, usando ejemplos a partir de sus plantas del guisante. En la Figura 20.14 se cuentan las bases para la ley de la segregación en los alelos que controlan el color de la semilla en una planta del guisante heterocigota con genotipo *Yy*. (Los guisantes tienen siete pares de cromosomas, pero sólo se muestra el par que porta los alelos para el color de la semilla.) Durante la meiosis, los dos cromosomas homólogos, cada uno con sus dos cromátidas hermanas, forman la sinapsis durante la profase I, alineándose juntos en el ecuador del huso en metafase I, y después se segregan en células hijas separadas. La segunda división meiótica separa cromátidas hermanas, de tal manera que cada célula haploide termina al final con sólo un alelo para el color de la semilla *Y* o *y*.

En la Figura 20.15 se ilustran las bases para la ley de la segregación independiente de los cromosomas que portan los genes para el color de la semilla (alelos *Y* e *y*) y para la forma de la semilla (alelos *R* y *r*, donde *R* porta información para semillas redondas, un carácter dominante, y *r* para semillas rugosas, un carácter recesivo). La explicación para la segregación independiente es que hay dos disposiciones posibles e igualmente probables de los pares de cromosomas en metafase I. De las células *YyRr* que sufren meiosis, la mitad producirá gametos como los cuatro de la zona inferior izquierda de la figura y la mitad producirá gametos como los cuatro de la zona inferior derecha. Además, la planta *YyRr* producirá igual número de gametos de los ocho tipos.

Como veremos en breve, la ley de la segregación independiente está *garantizada* solamente en genes que se encuentran en cromosomas *diferentes*. Es de destacar que a Mendel se le ocurrió escoger siete caracteres que segregaban de manera independiente en un organismo que tiene sólo siete pares de cromosomas. Mendel tuvo la suerte de que cada uno de los siete caracteres que eligió estudiar resultó estar controlado por un único gen (par de alelos). Quizás se concentró en líneas de guisantes, que en experimentos preliminares, le proporcionaron los resultados más consistentes y comprensibles.

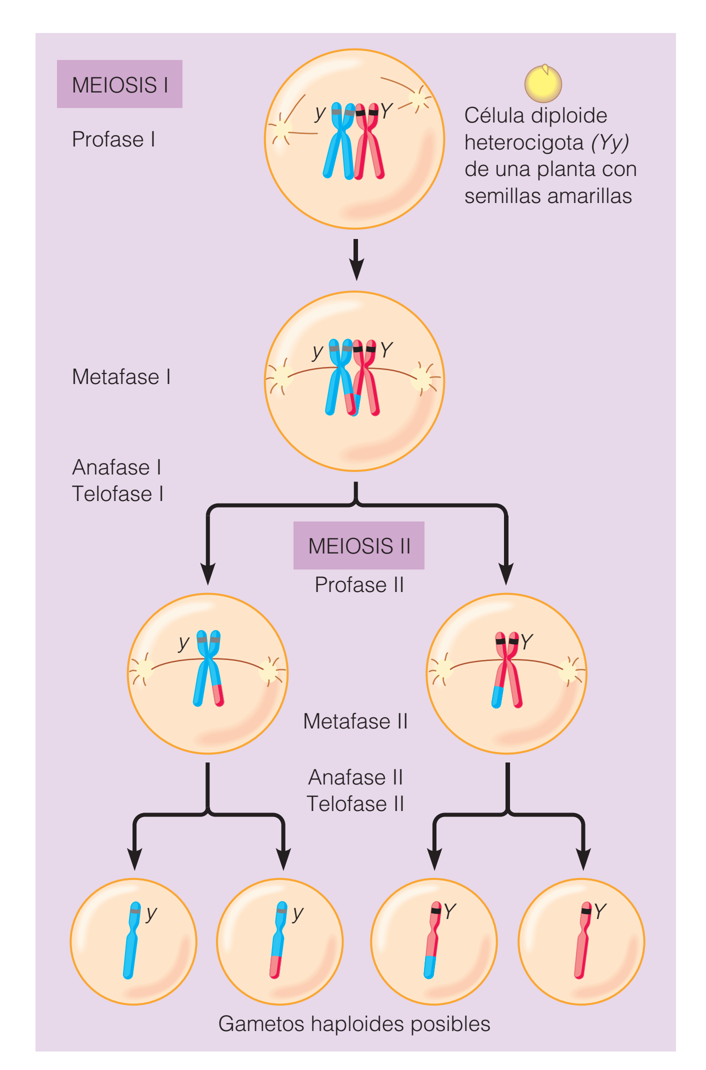


Figura 20.14 Bases meióticas para la ley de Mendel de la segregación. Se ilustra la segregación de los alelos para el color de la semilla durante la meiosis, en el caso de una planta de guisante heterocigota para este carácter. Los guisantes tienen siete pares de cromosomas, pero sólo se muestra el par de homólogos que porta los alelos para el color de la semilla. Durante la primera división meiótica (meiosis I) los cromosomas homólogos (cada uno con sus dos cromátidas hermanas) se emparejan en la profase I permitiendo el sobrecruzamiento. Posteriormente, durante la metafase I, los cromosomas homólogos se alinean en parejas en el ecuador del huso y en anafase I y en telofase I se segregan en células separadas. En la meiosis II, las cromátidas hermanas se segregan en células hijas diferentes. El resultado son cuatro células hijas haploides, cada una de ellas tiene un alelo para el color de la semilla.

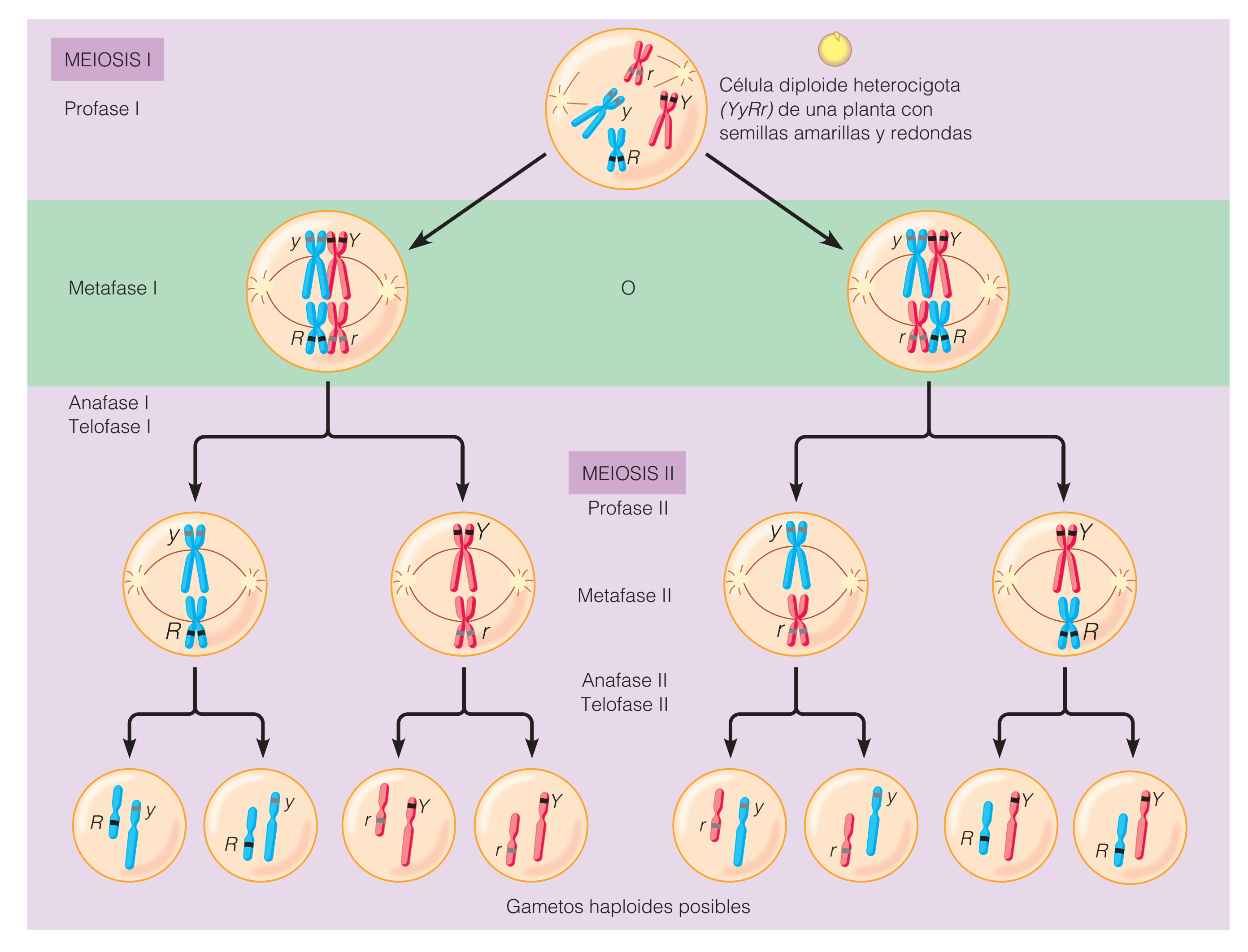


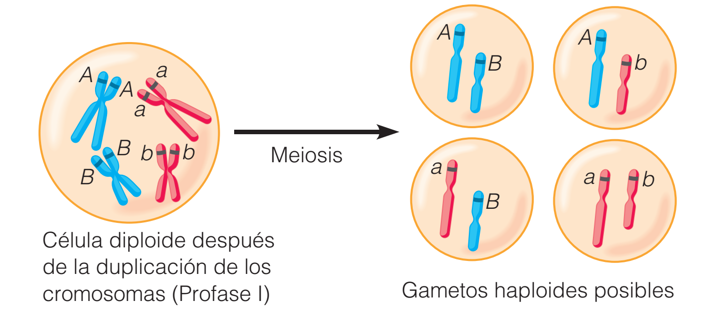
Figura 20.15 Bases meióticas para la ley de Mendel de la distribución independiente. Se ilustra la distribución independiente, durante la meiosis, de los alelos de dos genes situados en cromosomas diferentes para el caso de una planta de guisante heterocigota para el color de la semilla (*Yy*) y para la forma de la semilla (*Rr*). Las plantas del guisante tienen siete pares de cromosomas, pero sólo se muestran los dos pares que portan los alelos para el color de la semilla y para la forma de la semilla. Durante la meiosis, la segregación de los alelos para el color de la semilla se produce de manera independiente a la segregación de los alelos para la forma de la semilla. Las bases de esta distribución independiente se encuentran en la metafase I, cuando las parejas de homólogos (bivalentes) se alinean en el ecuador del huso. Cada bivalente puede quedar orientado en cualquier dirección. De manera consecuente, hay dos situaciones alternativas: o bien ambos homólogos paternos (azules) quedan orientados hacia el mismo polo de la célula, con los homólogos maternos (rojos) orientados hacia el otro polo, o pueden orientarse hacia polos opuestos. La disposición de los homólogos en metafase I determina qué homólogos irán posteriormente a cada célula hija. Puesto que las posiciones alternativas ocurren con la misma probabilidad, se producen por lo tanto con la misma probablidad todas las combinaciones posibles de alelos en los gametos. Para simplificar, los quiasmas y los sobrecruzamientos no se muestran en este diagrama.

Las moléculas de DNA de cromosomas homólogos tienen una secuencia de bases similar

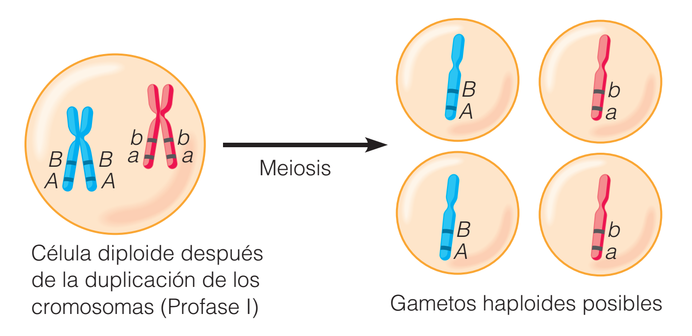
Uno de los cinco puntos principales de la teoría cromosómica de la herencia es la idea de que los cromosomas homólogos son equivalentes funcionalmente, cada uno porta un juego similar de genes. ¿Qué significa esto en términos de nuestro conocimiento actual sobre la organización molecular del cromosoma? Dicho simplemente, significa que los cromosomas homólogos tienen moléculas de DNA cuyas secuencias de bases son casi, pero no completamente, idénticas. Así, los cromosomas homólogos de forma típica portan los mismos genes, exactamente en el mismo orden. Sin embargo, pequeñas diferencias en la secuencia de bases a lo largo de la molécula de DNA del cromosoma, pueden crear diferentes alelos del mismo gen. Tales diferencias surgen por mutación, y los diferentes alelos que encontramos en la población para un gen —bien sea de plantas de guisante o de personas— surgen a partir de mutaciones que se han producido gradualmente en un gen ancestral. Los alelos normalmente «se expresan» por transcripción en RNA

y por traducción en proteínas, y es el comportamiento de esas proteínas lo que finalmente crea el fenotipo de un individuo. Como veremos en el Capítulo 21, un cambio tan pequeño como un único par de bases de DNA puede crear un alelo que codifique para una proteína alterada que es lo suficientemente diferente como para causar un cambio observable en el fenotipo de un organismo —de hecho, una alteración de este tipo en el DNA, puede ser letal—.

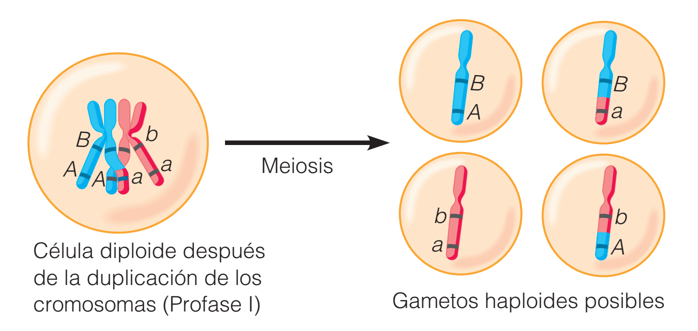
Las similitudes subyacentes en la secuencia de bases de sus moléculas de DNA —*homología del DNA*— probablemente explican la capacidad de los cromosomas homólogos para sufrir sinapsis (emparejamiento estrecho) durante la meiosis y es esencial para un sobrecruzamiento normal. Un modelo popular para la sinapsis, mantiene que el correcto alineamiento de los cromosomas, se produce antes de la finalización del complejo sinaptonémico por algún tipo de interacción de pares de bases entre las regiones de equivalencia del DNA de los dos cromosomas. Entonces, después de que el complejo sinaptonémico esté completamente formado, se completa la recombinación del DNA en estos sitios (y quizás en otros).



(a) Los genes no ligados se distribuyen de forma independiente



(b) Los genes ligados se transmiten juntos en ausencia de sobrecruzamiento



(c) Los genes ligados no se transmiten juntos si se produce sobrecruzamiento

Figura 20.16 Segregación y distribución de genes ligados y no ligados. En esta figura, *A* y *a* son alelos de un gen, y *B* y *b* son alelos de otro gen. (**a**) Los alelos de genes de cromosomas diferentes se segregan y se distribuyen de manera independiente durante la meiosis; el alelo *A* es tan probable que aparezca en un gameto con el alelo *B* como con el *b*. (**b**) Los alelos de genes en el mismo cromosoma se mantienen ligados durante la meiosis en ausencia de sobrecruzamiento; en este caso, el alelo *A* aparecerá de manera rutinaria con el alelo *B* en el mismo gameto, pero no con el alelo *b*. (**c**) Los alelos de los genes en el mismo cromosoma se pueden intercambiar cuando tiene lugar el sobrecruzamiento, de tal manera que el alelo *A* aparece no sólo con el alelo *B* sino también con el alelo *b* y así sucesivamente.

Variabilidad genética: recombinación y sobrecruzamiento

La segregación y la distribución independiente de los cromosomas homólogos durante la primera división meiótica conducen a la distribución aleatoria de los alelos que portan los diferentes cromosomas, como se muestra en la Figura 20.15 para la forma y el color de la semilla en las plantas del guisante. La Figura 20.16a resume el resultado de la meiosis para una versión general de la misma situación. Aquí tenemos a un organismo diploide, heterocigoto para dos genes en cromosomas no homólogos, con los pares de alelos denominados *Aa* y *Bb*. La meiosis en un organismo de este tipo producirá gametos en los que es tan probable que el alelo *A* aparezca con el alelo B como que lo haga con el *b*, y que es tan probable que el alelo *B* aparezca con *A* como con el *a*. Pero, ¿qué sucede si los genes *A* y *B* residen en el mismo cromosoma? En este caso, los alelos *A* y *B* aparecerán de forma rutinaria ligados y juntos en el mismo gameto, como lo estarán los alelos *a* y *b* (Figura 20.16b).

Pero, incluso para los genes del mismo cromosoma tienen lugar mezclas de alelos debido al fenómeno del sobrecruzamiento, que conduce a la recombinación genética. La recombinación genética implica el intercambio de material genético entre cromosomas homólogos durante la profase I de la meiosis, cuando los homólogos realizan la sinapsis y crean cromosomas que muestran una nueva combinación de alelos (Figura 20.16c). La recombinación se descubrió originalmente en estudios que empezaron alrededor de 1910 y que se realizaron por Thomas Hunt Morgan y colaboradores con la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Volveremos, por lo tanto, al trabajo de Morgan para investigar la recombinación, empezando con su descubrimiento de los grupos de ligamiento.

Los cromosomas contienen grupos de genes ligados que normalmente se heredan juntos

Las moscas de la fruta utilizadas por Morgan y sus colaboradores presentaban ciertas ventajas, como objetos de estudio genético, con respecto a las plantas del guisante de Mendel. El menor de ellos no era el tiempo relativamente corto de generación de las moscas (alrededor de dos semanas frente a varios meses para las plantas del guisante). Sin embargo, a diferencia de los guisantes de Mendel, las moscas de la fruta no venían con una variedad de genotipos y fenotipos ya hechos. Mientras que Mendel era capaz de comprar reservas de semillas de diferentes variedades de líneas puras, inicialmente el único tipo de mosca de la fruta disponible, era el que ha venido a llamarse «tipo salvaje» u organismo «normal». Además, Morgan y sus colaboradores tuvieron que generar variantes —es decir, mutantes— para sus experimentos genéticos.

Morgan y sus colegas empezaron por criar grandes cantidades de moscas y luego seleccionaron a los individuos mutantes que tenían modificaciones fenotípicas heredables. (Más tarde, se utilizaron las radiaciones X para aumentar la tasa de mutación, pero en sus primeros trabajos, el grupo de Morgan dependía por completo de las mutaciones espontáneas.) En cinco años, fueron capaces de identificar unos 85 mutantes diferentes, cada uno portaba una mutación en un gen diferente. Cada uno de estos mutantes se generalizaría como una reserva del laboratorio que se usaría para los cruzamientos cuando se necesitase.

Una de las primeras cosas de las que se dieron cuenta Morgan y sus colaboradores en cuanto empezaron a analizar sus mutantes, es que a diferencia de los genes que Mendel había estudiado en los guisantes, los genes mutantes de la mosca de la fruta no se distribuían de manera independiente. En vez de esto, algunos genes se comportaban como si estuviesen ligados, y para tales genes, las nuevas combinaciones previstas por Mendel eran infrecuentes o incluso inexistentes. De hecho, pronto se reconoció que los genes de la mosca de la fruta se podían clasificar en cuatro **grupos de ligamiento**, cada grupo consistía en una colección de **genes ligados** que normalmente se heredaban juntos. Morgan se dio cuenta rápidamente de que el número de grupos de ligamiento era el mismo que el número de cromosomas diferentes en el organismo, ya que el número de cromosomas haploides para *Drosophila* es cuatro. La conclusión era obvia. Cada cromosoma es la base física para un grupo de ligamiento específico. Mendel no había observado ligamiento ya que los genes que él había estudiado, resultó que residían en cromosomas diferentes, de manera que no estaban ligados unos a otros.

Los cromosomas homólogos intercambian segmentos durante el sobrecruzamiento

Aunque los genes que ellos descubrieron podían estar todos organizados en grupos de ligamiento, Morgan y sus colaboradores descubrieron que el ligamiento dentro de tales grupos era incompleto. La mayoría de las veces, los genes que se sabía que estaban ligados (y además en el mismo cromosoma) se distribuían juntos, como era de esperar. Sin embargo, otras veces dos o más de tales caracteres aparecían en la descendencia en combinaciones que no eran las parentales. Este fenómeno de ligamiento menos-que-completo (ligamiento parcial) fue denominado *recombinación* debido a que en la descendencia aparecían diferentes alelos en asociaciones nuevas e inesperadas.

Para explicar esta descendencia recombinante, Morgan propuso que los cromosomas homólogos podían intercambiar segmentos, presumiblemente por algún tipo de evento de corte y fusión, como se ilustra en la Figura 20.17a. Mediante este proceso, al que Morgan le puso el término de *sobrecruzamiento*, un alelo en particular o un grupo de alelos presentes inicialmente en un miembro de una pareja de cromosomas homólogos podía ser transferido a otro cromosoma de forma recíproca.

En el ejemplo de la Figura 20.17a, dos cromosomas homólogos, uno con los alelos *A* y *B* y el otro con los alelos *a* y *b*, yacen uno al lado del otro en la sinapsis. Entonces, porciones de la cromátida *AB* y de una cromátida no hermana *ab* intercambian segmentos de DNA, produciendo dos cromátidas recombinantes, una con los alelos *A* y *b* y la otra con los alelos *a* y *B*. Cada una de las cuatro cromátidas termina en un gameto diferente al final de la segunda división meiótica, de forma que el producto de la meiosis incluirá dos gametos *parentales* y dos gametos *recombinantes*, si asumimos un único episodio de sobrecruzamiento (Figura 20.17b).

Ahora sabemos que el sobrecruzamiento tiene lugar en la etapa de paquitene de la profase I meiótica (*véase* Figura 20.7), en el momento en que las cromátidas hermanas se empaquetan estrechamente y es difícil observar qué está pasando. Como las cromátidas empiezan a separarse en diplotene, cada una de las cuatro cromátidas de un bivalente se puede identificar como perteneciente a uno o a otro de los dos homólogos. Allí donde se ha producido un sobrecruzamiento entre las cromátidas no hermanas, los dos homólogos quedan unidos formando un quiasma.

En la primera metafase meiótica, los cromosomas homólogos casi siempre se mantienen juntos por lo menos por un quiasma; si no, puede que no se segreguen apropiadamente. Muchos bivalentes contienen múltiples quiasmas. Los bivalentes humanos, por ejemplo, generalmente tienen dos o tres quiasmas debido a los múltiples episodios de sobrecruzamiento que ocurren de forma rutinaria entre parejas de homólogos. Para tener significación genética, los sobrecruzamientos deben implicar a cromátidas no hermanas. En algunas especies, también se han observado intercambios entre cromátidas hermanas, pero tales intercambios no tienen consecuencias genéticas debido a que las cromátidas hermanas son idénticas genéticamente.

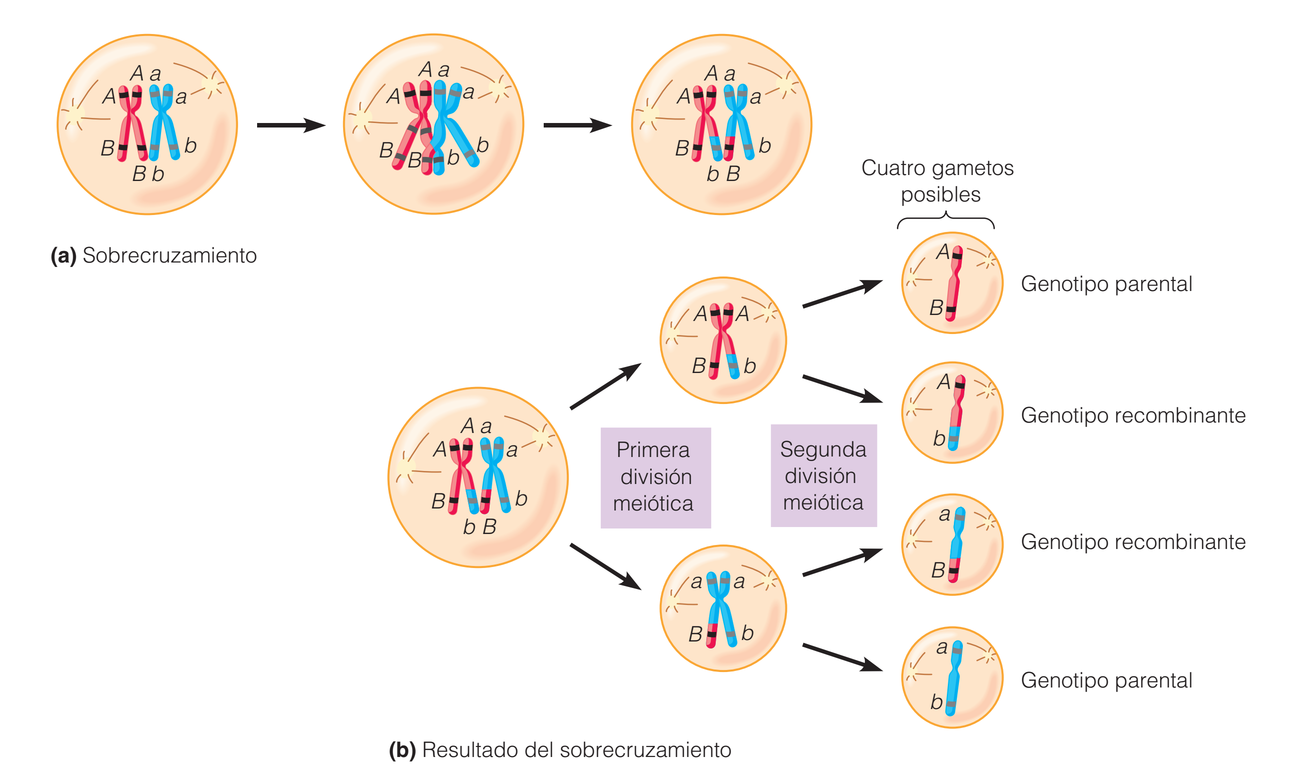


Figura 20.17 Sobrecruzamiento y recombinación genética. Como en la Figura 20.16, *A* y *a* son alelos de un gen, y *B* y *b* son alelos de otro gen. (**a**) Dos cromosomas homólogos, uno que porta los alelos *A* y *B* y el otro los alelos *a* y *b*, se emparejan en la profase I. Dos cromátidas no hermanas sufren sobrecruzamiento, provocando que porciones de cada uno intercambien sus posiciones. El resultado son dos cromátidas recombinantes, con los alelos *A* y *b* en una de las cromátidas y los alelos *a* y *B* en la otra. (**b**) Cada cromátida termina en un gameto separado, dos de los cuales tienen los genotipos parentales (*AB* y *ab*) y dos los genotipos recombinantes (*Ab* y *aB*).

Se pueden construir mapas con la localización de los genes midiendo las frecuencias de recombinación

Finalmente, quedó claro para Morgan y colaboradores que la frecuencia de la progenie recombinante difería para los diferentes pares de genes dentro de los distintos grupos de ligamiento, pero que era marcadamente constante para un par específico de genes. Esto sugiere que la frecuencia de recombinación observada entre dos genes podría ser una medida de la distancia a la que están localizados unos de otros a lo largo del cromosoma. Si la probabilidad de sobrecruzamiento es la misma en cada punto de la cromátida (una asunción que parece estar justificada en la mayor parte de los casos), entonces sería menos probable que los genes que están localizados muy cerca unos de otros se separasen por un episodio de sobrecruzamiento que los genes que están más alejados entre sí.

De hecho, rápidamente se dieron cuenta de que la frecuencia de recombinación expresada como el porcentaje de progenie que era recombinante, era una manera útil de cuantificar la distancia entre genes diferentes. Esta aproximación condujo a Edward Sturtevant, un estudiante de pregrado en el laboratorio de Morgan, a sugerir en 1911 que los datos de recombinación se podrían utilizar para determinar dónde estaban localizados los genes en el cromosoma de *Drosophila*. Así, se había conseguido visualizar al cromosoma como una cuerda de genes lineal cuyas posiciones se podían determinar en base a los datos de recombinación.

Determinar el orden secuencial y espacial de los genes en un cromosoma basándose en las frecuencias de recombinación se denomina **mapeo genético**. En la construcción de tales mapas, la frecuencia de recombinación es la distancia en el mapa expresada en *unidades de mapa*. Si, por ejemplo, los alelos de la Figura 20.17b aparecen entre la progenie en su combinación parental (*AB* y *ab*) el 15% de las veces, concluiremos que los dos genes están ligados (están en el mismo cromosoma) y están a una distancia de 15 unidades de mapa. Esta aproximación se ha utilizado para hacer un mapa de los cromosomas de muchas especies de plantas y de animales, así como de bacterias y de virus. Sin embargo, puesto que las bacterias y los virus no se reproducen sexualmente, los métodos utilizados para generar recombinantes son un tanto diferentes.

Recombinación genética en bacterias y virus

A partir de lo que hemos dicho anteriormente, se podía suponer que la recombinación genética se restringe a los organismos que se reproducen sexualmente puesto que la recombinación depende del sobrecruzamiento entre cro-

mosomas homólogos. Como hemos visto, la reproducción sexual proporciona una oportunidad para la recombinación una vez por generación cuando los cromosomas homólogos están yuxtapuestos estrechamente durante las divisiones meióticas que producen los gametos. Por el contrario, las bacterias y los virus podrían parecer candidatos pobres a la recombinación debido a que tienen genomas haploides y se reproducen asexualmente, con ningún mecanismo obvio para reunir, de manera regular, genomas de dos padres diferentes.

No obstante, los virus y las bacterias son todavía capaces de recombinarse genéticamente. De hecho, los datos de recombinación, han permitido un mapeo extenso de genomas víricos y bacterianos mucho antes del advenimiento de la tecnología moderna del DNA. Para entender cómo tiene lugar la recombinación, a pesar de tener un genoma haploide, necesitamos examinar el mecanismo que permite a dos genomas haploides, o porciones de genomas, aparecer juntos en la misma célula.

La infección conjunta de bacterias con bacteriófagos relacionados puede conducir a recombinación genética

Mucho de nuestro conocimiento actual sobre los genes y la recombinación a nivel molecular, así como el vocabulario con el que expresamos esta información, viene de experimentos que implican a bacteriófagos, particularmente a los fagos T-par y al fago λ (*véase* Anexo 18A). Aunque los fagos son haploides y no se reproducen sexualmente, la recombinación genética entre fagos emparentados puede tener lugar cuando las bacterias individuales se infectan simultáneamente con versiones diferentes del mismo fago. La Figura 20.18 ilustra un experimento en el que las bacterias se infectan conjuntamente con dos tipos de fagos T4 emparentados. A medida que los fagos se replican en la célula bacteriana, sus moléculas de DNA quedan ocasionalmente yuxtapuestas de manera que se favorece el intercambio de segmentos de DNA de regiones homólogas. El fago recombinante resultante surge con una frecuencia que depende de la distancia entre los genes en estudio, igual que en los organismos diploides. En general cuanto más alejados estén los genes, mayor será la probabilidad de recombinación entre ellos.

En la recombinación de los fagos, el sobrecruzamiento implica a moléculas de DNA desnudas, relativamente cortas, más que a cromátidas. La simplicidad de esta situación ha facilitado la investigación sobre los mecanismos moleculares de la recombinación y las proteínas que catalizan el proceso. Está claro que la recombinación de los fagos implica una alineación precisa de moléculas de DNA homólogo en la región del sobrecruzamiento —un requerimiento que se mantiene también, presumiblemente, para la recombinación del DNA eucariótico y procariótico—.

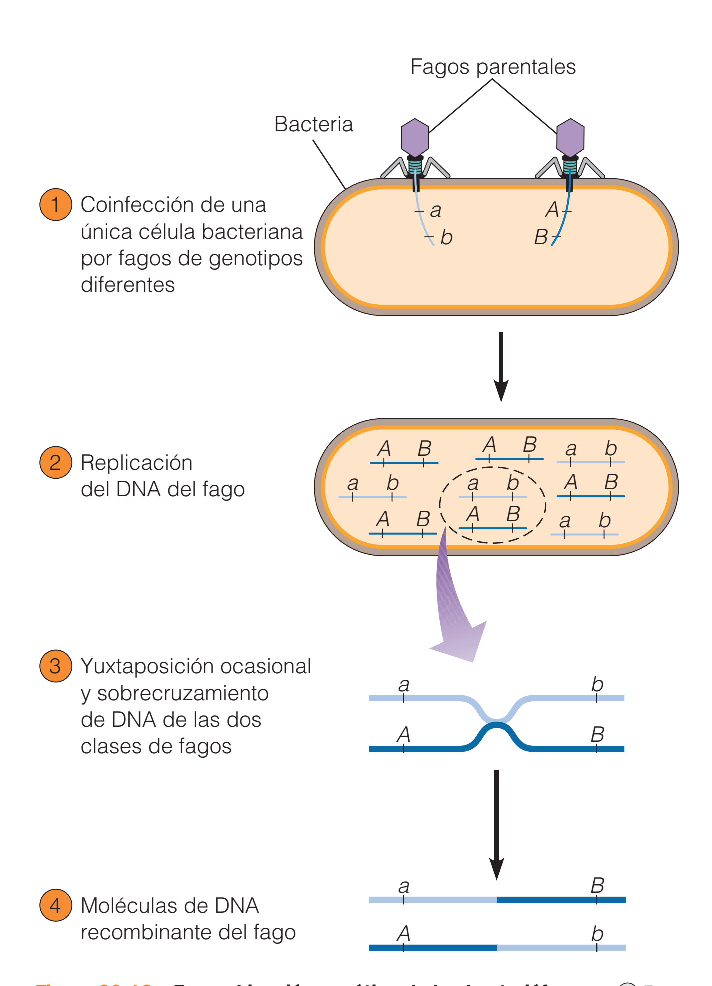


Figura 20.18 Recombinación genética de los bacteriófagos. ① Dos poblaciones de fagos parentales con genotipos diferentes se utilizan para infectar conjuntamente a una bacteria, asegurando, de esta forma, la presencia simultánea de ambas clases de genomas de fagos en una única bacteria. Uno de los fagos parentales porta los alelos mutantes *a* y *b*, mientras que el otro tiene los alelos *A* y *B*. ② A medida que las moléculas de DNA del fago se replican, ③ ocasionalmente se yuxtaponen, de manera que se produce sobrecruzamiento y recombinación ④ dando lugar a moléculas de DNA de fago recombinantes. La frecuencia con la que se producen los genotipos recombinantes proporciona una medida de la distancia entre los genes. (Como en otros casos, los biólogos determinan los genotipos de las partículas de fago de la progenie a partir de los fenotipos que muestran. Un ejemplo del fenotipo de un fago es el tamaño de las placas que forman en un tapiz bacteriano.)

La transformación y la transducción implican recombinación con DNA libre o con DNA introducido en las bacterias por bacteriófagos

En las bacterias, existen varios mecanismos para recombinar la información genética. Uno de esos mecanismos, ya se ha mencionado en el Capítulo 18, donde tratamos los experimentos con cepas lisas y rugosas de la bacteria neumococo que condujeron a Oswald Avery a concluir que las bacterias se pueden transformar en un tipo genético o en otro al exponerlas a DNA purificado. Esta capacidad de una

bacteria para captar moléculas de DNA e incorporar algo de ese DNA en su propio genoma se denomina **transformación** (Figura 20.19a). Aunque inicialmente descrita como una técnica de laboratorio para introducir DNA de forma artificial en las bacterias, actualmente se reconoce la transformación como un mecanismo natural por el cual algunos tipos de bacterias (aunque eso no significa que todos) adquieren información genética cuando tienen acceso al DNA de otras células.

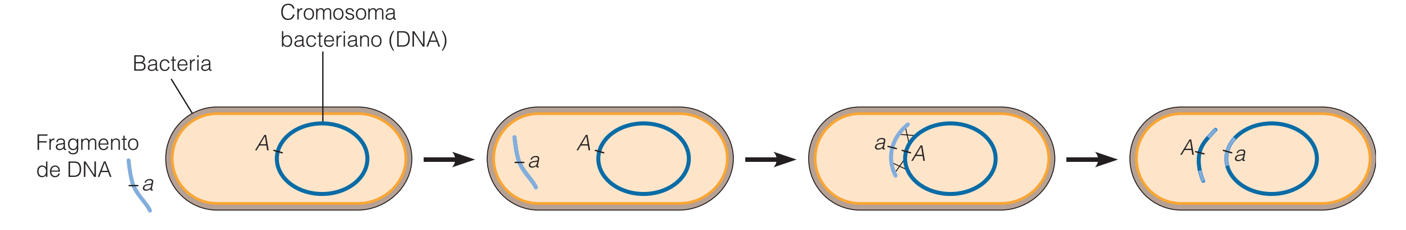
Un segundo mecanismo de recombinación genética en las bacterias, llamado **transducción**, implica al DNA introducido en una bacteria por un bacteriófago. La mayoría de los fagos contienen sólo su propio DNA, pero ocasionalmente un fago incorporará secuencias del DNA de la célula huésped bacteriana en las partículas de su progenie. Entonces esa partícula del fago, puede infectar a otra bacteria, actuando como una jeringuilla que lleva DNA de una célula bacteriana a otra (Figura 20.19b). Los fagos capaces de portar el DNA de una célula huésped de una a otra célula se denominan *fagos transductores*.

El fago transductor conocido como P1, que infecta a *E. coli*, es especialmente útil en la formación de mapas genéticos. La cantidad de DNA que entra en una partícula de fago es pequeña comparada con el tamaño del genoma bacteriano. Dos genes bacterianos —o más generalmente, marcadores genéticos (secuencias específicas de DNA)— deben estar estrechamente unidas, para que una única partícula de fago, transporte ambas simultáneamente, a una bacteria. Ésta es la base del *mapeo cotransduccional*, en el que la proximidad de un marcador a otro se determina cuantificando la frecuencia con la que los marcadores aparecen unidos unos a otros en una partícula de fago transductor.

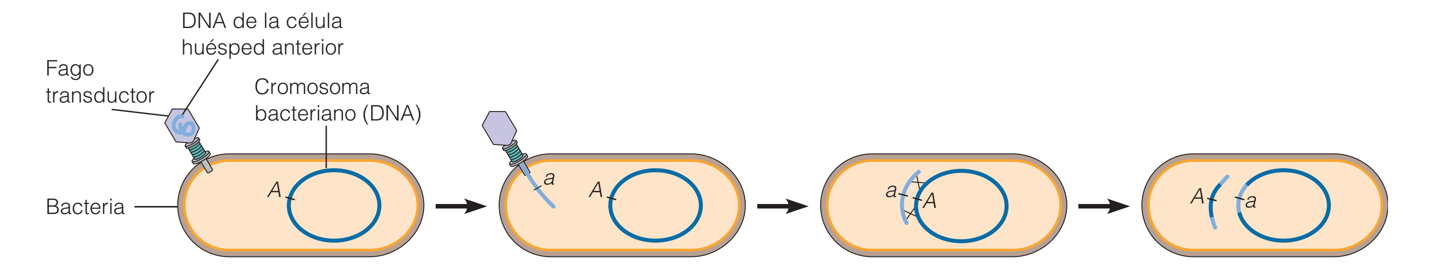
Cuanto más cerca estén los dos marcadores, más probable será que se transduzcan conjuntamente en una bacteria. Los estudios que utilizan el fago transductor P1 han revelado que los marcadores no se pueden transducir si están separados en el DNA bacteriano más de 10^5 pares de bases. Estos descubrimientos concuerdan con la observación de que el fago P1 tiene un genoma de aproximadamente ese tamaño.

La conjugación es una actividad sexual modificada que facilita la recombinación genética en las bacterias

Además de la transformación y la transducción, algunas bacterias también transfieren DNA de una célula a otra por **conjugación**. Como sugiere su nombre, la conjugación recuerda un apareamiento en el que una bacteria se identifica claramente como el donante (a menudo llamado «macho») y otra como el receptor («hembra»). Aunque la conjugación parece un proceso sexual, esta modalidad de transferencia de DNA, no es una parte inherente del ciclo



(a) Transformación de una bacteria por DNA exógeno



(b) Transducción de una bacteria por un fago transductor

Figura 20.19 Transformación y transducción en bacterias. (**a**) La transformación implica que la bacteria capta DNA exógeno, que ocasionalmente será integrado en el genoma bacteriano por dos acontecimientos de sobrecruzamiento (indicado por X). El DNA exógeno se detectará en las células de la progenie sólo si se integra en el cromosoma bacteriano, ya que el fragmento de DNA que inicialmente se capta no tiene normalmente capacidad para replicarse de manera autónoma en la célula. (La principal excepción es un plásmido intacto.) (**b**) La transducción implica que un fago introduzca DNA exógeno en una bacteria. Una vez inyectado en la célula huésped, el DNA se puede integrar en el genoma bacteriano de la misma forma en la que se hace en una transformación. En ambos casos, fragmentos lineales de DNA que terminan fuera del cromosoma bacteriano son finalmente degradados por nucleasas. En esta figura, las letras *A* y *a* representan alelos del mismo gen.

vital bacteriano, y habitualmente sólo implica a una porción del genoma; por tanto, no reúne las condiciones de una reproducción sexual verdadera. La existencia de la conjugación se propuso en 1946 por Joshua Lederberg y Edward L. Tatum, quienes fueron los primeros en demostrar que la recombinación genética se produce en las bacterias. También establecieron que el contacto físico entre dos células es necesario para que tenga lugar la conjugación. Ahora entendemos que la conjugación implica la transferencia direccional de DNA desde la bacteria donante hasta la bacteria receptora. Veamos algunos detalles de cómo funciona el proceso.

El factor F. La presencia de una secuencia de DNA denominada el **factor F** (F por fertilidad) permite a la célula de *E. coli* actuar como un donante durante la conjugación. El factor F puede tener la forma de un plásmido independiente con capacidad para replicarse (página 582) o un segmento del DNA en el cromosoma bacteriano. La bacteria donante que contiene el factor F en su plásmido se designa F^+, mientras que las células receptoras, a las que normalmente les falta el factor F por completo, se designan como F^-. Las células donantes desarrollan proyecciones largas con forma de pelo denominadas **pili sexuales** (singular: **pilus**) que surgen desde la superficie celular (Figura 20.20a). El final de cada pilus sexual contiene moléculas que se unen selectivamente a la superficie de las células receptoras, conduciendo, de esta forma a la formación de un **puente de apareamiento** citoplasmático transitorio a través del cual el DNA se transfiere desde la célula donante a la célula receptora (Figura 20.20b).

Cuando una célula donante contiene un factor F en su plásmido durante la conjugación, una copia del plásmido se transfiere rápidamente a la célula receptora, convirtiendo a la célula receptora de F^- a F^+ (Figura 20.21a). La transferencia empieza siempre en un punto del plásmido llamado **origen de transferencia**, representado en la figura por una punta de flecha. Durante la transferencia de un factor F a una célula F^-, la célula donante no pierde su estatus F^+, ya que el factor F se replica concomitantemente con el proceso de transferencia, permitiendo que quede una copia del plásmido F en la célula donante. Como resultado, al mezclar una población de bacterias F^+ con células F^-, se obtendrá finalmente una población enteramente F^+. La «masculinidad» es en cierto sentido infecciosa y el factor F el agente infeccioso.

Las células Hfr y la transferencia del cromosoma bacteriano. Hasta ahora hemos visto que las células donante y receptora se definen por la presencia o ausencia del factor F, el cual a su vez, se transmite por conjugación; pero, ¿cómo surgen bacterias recombinantes de este modo? La respuesta es que el factor F —aunque normalmente está presente como plásmido— a veces puede llegar a integrarse en el cromosoma bacteriano, como se muestra en la Figura 20.21b. (La integración resulta del sobrecruzamiento entre secuencias cortas de DNA del cromosoma y secuencias similares del factor F.) La integración del factor F en el cromosoma, convierte a una célula donante F^+, en una **célula Hfr** (del inglés *h*igh *f*requency of *r*ecombination), que es capaz de producir una alta frecuencia de recombinación en futuros apareamientos ya que ahora puede transferir *DNA genómico* durante la conjugación. Cuando una bacteria Hfr se aparea con un receptor F^-, el DNA se transfiere a la célula receptora (Figura 20.21c). Pero en vez de transferirse sólo el factor F, la célula Hfr transfiere al menos parte (y ocasionalmente todo) su DNA cromosómico, conservando una copia

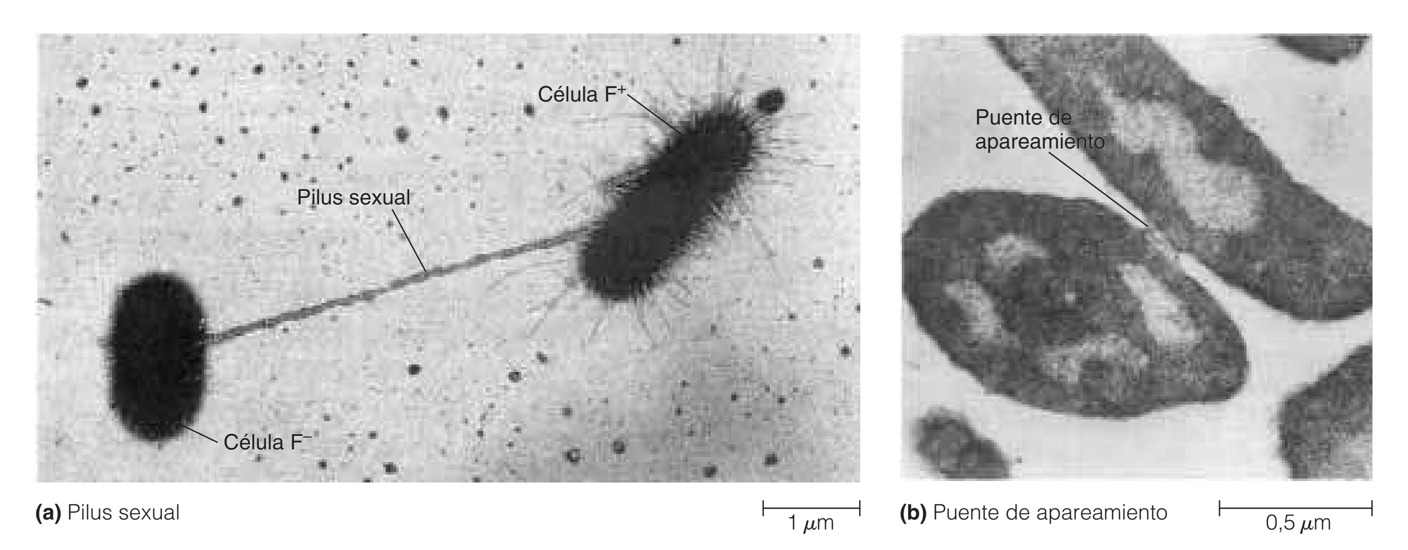
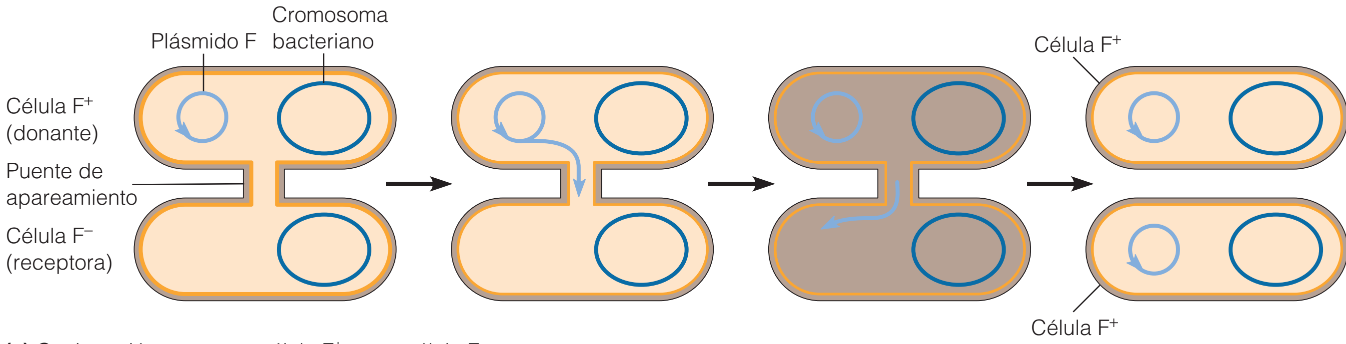
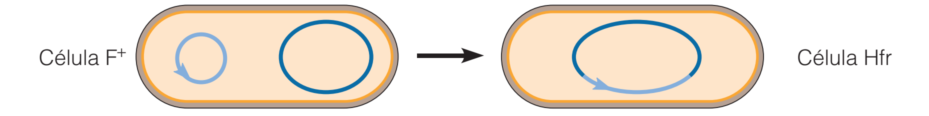


Figura 20.20 El aparato celular para la conjugación bacteriana. (**a**) La bacteria donante de la derecha, una célula F^+, tiene numerosos apéndices finos en su superficie, denominados pili. Algunos de éstos son pili sexuales, incluyendo un pilus muy largo que se dirige hacia la otra célula, una célula F^-. Los pili sexuales, constituidos por proteína codificada por un gen situado en el factor F, le permiten a la célula donante adherirse a una célula receptora. (**b**) Posteriormente, se forma un puente citoplasmático de apareamiento, a través del cual el DNA pasa de la célula donante a la célula receptora (MET).





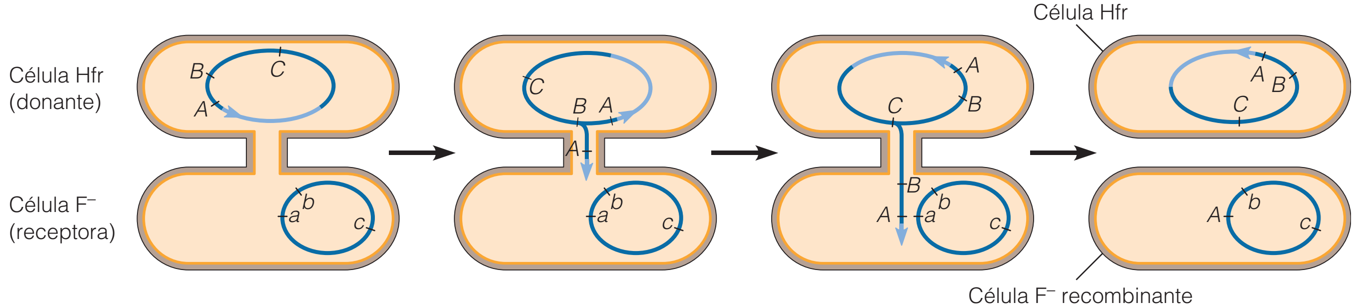


Figura 20.21 **Transferencia de DNA por conjugación bacteriana.** (**a**) Conjugación entre una bacteria donante F^+ y una bacteria receptora F^- que implica la transferencia de una copia del plásmido factor F, del donante al receptor, convirtiendo de esta forma a una célula F^- en una célula F^+. La transferencia del plásmido F se produce a través de un puente de apareamiento y empieza siempre en el origen de transferencia del factor F, indicado por la cabeza de flecha. (**b**) Conversión de una célula F^+ en una célula Hfr por integración del factor F en el cromosoma bacteriano. (**c**) La conjugación entre una célula donante Hfr y una célula F^- implica la transferencia de una copia de genoma Hfr a través de un puente de apareamiento en la célula F^-, empezando en el origen de transferencia del factor F integrado. Normalmente la transferencia es incompleta, puesto que las células raramente se quedan en contacto, apareándose lo suficiente como para que el cromosoma bacteriano se transfiera por completo. Una vez dentro de la célula F^-, parte del DNA Hfr puede sufrir recombinación con el DNA de la célula F^-, igual que en la transformación o en la transducción (*véase* Figura 20.19). Aquí las letras mayúsculas representan los alelos portados por el Hfr; las letras minúsculas representan los alelos correspondientes portados por las células F^-. En el último paso, el alelo A de la célula Hfr se recombina en el DNA de la célula F^- en el lugar de su alelo *a*.

igual que en la transferencia de DNA F^+. La transferencia empieza en el origen de transferencia dentro del factor F integrado y progresa en una dirección dictada por la orientación del factor F en el cromosoma. Preste atención a que el DNA cromosómico es transferido de forma lineal, con una pequeña parte del factor F al principio y el resto al final. Dado que el factor F se corta de esta forma, sólo las células receptoras que reciben un cromosoma bacteriano completo del donante Hfr se convierten realmente en células Hfr. Sin embargo, la transferencia del cromosoma completo es extraordinariamente rara, ya que tarda alrededor de 90 minutos. Normalmente el apareamiento se interrumpe espontáneamente antes de que la transferencia sea completa dejando a la célula receptora con sólo una porción del cromosoma Hfr como se muestra en la Figura 20.21c. Como resultado los genes situados cerca del origen de transferencia en el cromosoma Hfr son los que se transmiten con mayor probabilidad a la célula receptora.

Después de que una porción del cromosoma Hfr se introduce en la célula receptora por conjugación, puede recombinarse con regiones del DNA cromosómico de la célula receptora que tenga secuencias homólogas (similares). Los cromosomas bacterianos recombinantes, generados por este proceso, contienen alguna información genética derivada de la célula donante y alguna del receptor. Sólo las secuencias de DNA que se integran con éxito por este meca-

nismo de recombinación, sobreviven en la célula receptora y su progenie. Tanto el DNA donante que no es integrado durante la recombinación como el DNA eliminado del cromosoma receptor durante el proceso de recombinación, son finalmente degradados por nucleasas.

La correlación entre la posición de un gen en el cromosoma bacteriano y su probabilidad de transferencia puede usarse para hacer mapas de genes con respecto al origen de transferencia y, por tanto, con respecto a los demás; por ejemplo, si un gen *A* de una célula Hfr se transfiere por conjugación el 95% de las veces, un gen *B* el 70% de las veces y un gen *C* el 55% de las veces, entonces la secuencia de los genes es *A*-*B*-*C*, siendo el gen *A* el más cercano al origen de transferencia. Además, dado que las células hijas de la bacteria receptora son recombinantes pueden usarse para análisis genético. Generalmente, se hace un cruce entre cepas Hfr y F^- que difieren en dos o más propiedades genéticas. Después de que ha tenido lugar la conjugación, se siembran las células en un medio nutritivo, sobre el que pueden crecer las cepas recombinantes pero no las «parentales», permitiendo así la detección de las recombinantes y el cálculo de las frecuencias de recombinación.

Mecanismos moleculares de la recombinación homóloga

Hemos descrito cinco situaciones diferentes en las que la información genética se puede intercambiar entre moléculas de DNA homólogo: (1) La profase I de la meiosis está asociada con la gametogénesis en eucariotas, (2) la co-infección de bacterias con bacteriófagos emparentados, (3) la transformación de bacterias con DNA, (4) la transducción de bacterias por fagos transductores y (5) la conjugación bacteriana. A pesar de sus obvias diferencias, las cinco situaciones comparten una característica fundamental: todas ellas implican **recombinación homóloga** en la que la información genética se intercambia entre moléculas de DNA que presentan una gran similitud de secuencia. Ahora, estamos preparados para tratar los mecanismos moleculares subyacentes a este tipo de recombinación. Puesto que los principios involucrados parecen ser bastante similares en procariotas y eucariotas, usaremos ejemplos de ambos tipos de organismos.

El corte e intercambio de DNA subyace a la recombinación homóloga

Poco después de descubrirse que la información genética se intercambia entre los cromosomas durante la meiosis, se propusieron dos teorías para explicar cómo podría ocurrir esto. El *modelo de rotura e intercambio* postulaba que los cortes ocurrían en las moléculas de DNA de dos cromosomas adyacentes, seguido por el intercambio y empalme de los segmentos rotos. Por el contrario, el *modelo de opción de copia* proponía que la recombinación genética ocurría mientras se replicaba el DNA, de acuerdo con esta última visión, la replicación del DNA empieza copiando una molécula de DNA localizada en un cromosoma y en un determinado punto cambia a copiar el DNA situado en el cromosoma homólogo. El resultado neto sería una nueva molécula de DNA que contiene información derivada de ambos cromosomas. Una de las predicciones más obvias del modelo de opción de copia es que la replicación del DNA y la recombinación genética deben ocurrir al mismo tiempo. Cuando estudios posteriores revelaron que la replicación del DNA tiene lugar durante la fase S mientras que la recombinación ocurre generalmente durante la profase I, la idea de opción de copia tuvo que ser descartada como modelo general de recombinación meiótica.

La primera prueba experimental a favor del modelo de rotura e intercambio se obtuvo en 1961 por Matthew Meselson y Jean Weigle, que emplearon fagos del mismo tipo genético, marcados o bien con el isótopo pesado del nitrógeno (^{15}N) o bien con el ligero (^{14}N). La infección simultánea de células bacterianas con esas dos cepas marcadas del mismo fago resultó en la producción de partículas de fago recombinantes que contenían genes derivados de ambos fagos. Cuando se examinó el DNA de esos fagos recombinantes se encontró que contenía una mezcla de ^{15}N y ^{14}N (Figura 20.22). Dado que estos experimentos se realizaron bajo condiciones que impedían la síntesis de nuevo DNA, las moléculas de DNA recombinante debían haberse producido por corte y empalme de moléculas de DNA derivadas de los dos fagos originales.

Experimentos posteriores que utilizaban bacterias cuyos cromosomas habían sido marcados con ^{15}N o con ^{14}N revelaron que también se produce DNA con mezcla de ambos isótopos durante la recombinación genética entre cromosomas bacterianos. Además, cuando tales moléculas de DNA recombinante se calientan para disociarlas en cadenas sencillas, se detecta una mezcla de ^{15}N y ^{14}N en cada una de las cadenas de DNA; por tanto, la doble hélice de DNA debe romperse y empalmarse durante la recombinación.

Poco después, J. Herbert Taylor llegó a una conclusión similar a partir de experimentos llevados a cabo en células eucarióticas. En estos estudios, las células fueron expuestas brevemente a ^{3}H-timidina durante la fase S anterior a la última mitosis previa a la meiosis, produciéndose cromátidas que contenían una hebra de DNA radiactiva por doble hélice. Durante la siguiente fase S, la replicación del DNA en ausencia de ^{3}H-timidina, producía cromosomas que contenían una cromátida marcada y una sin marcar (Figura 20.23). Pero durante la meiosis siguiente, las cromátidas individuales presentaban una mezcla de segmentos radiactivos y no radiactivos como se podría predecir por el modelo de rotura e intercambio. Además, la frecuencia de tales intercambios era directamente proporcional a la frecuencia con la que los genes situados en estas regiones sufrían recombinación genética. Tales observaciones apoyaban con

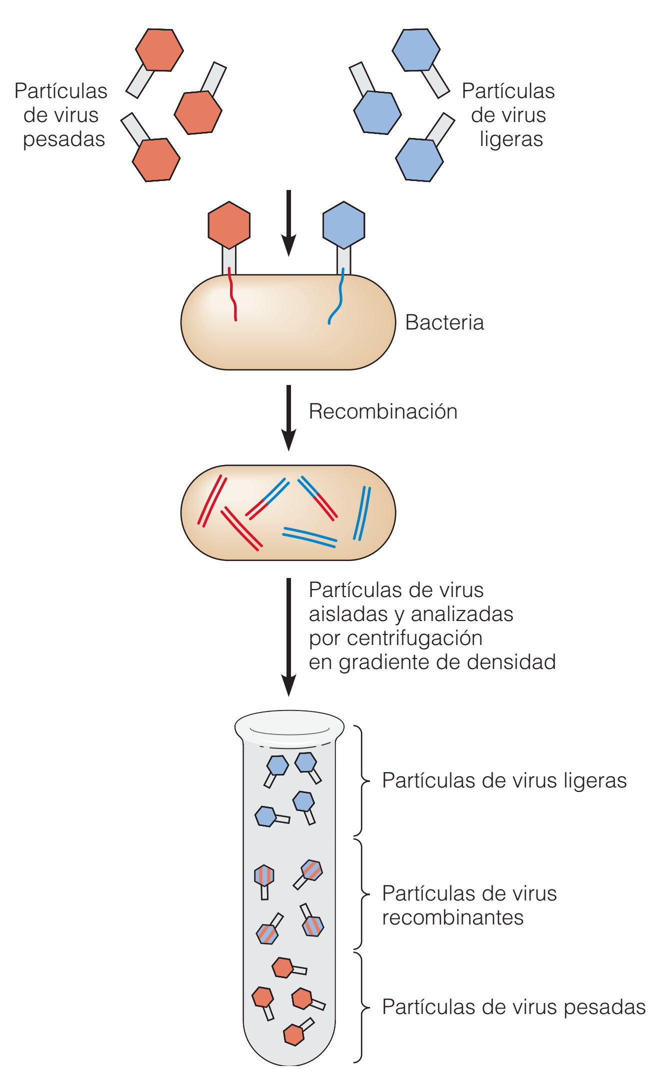


Figura 20.22 Evidencia del corte e intercambio de DNA durante la recombinación en bacteriófagos. En este experimento, las bacterias se infectaron con dos cepas del mismo fago, una marcada con ^{15}N y la otra con ^{14}N. Después de la recombinación, se vio que el DNA de los fagos recombinantes contenía tanto ^{15}N como ^{14}N, apoyando la idea de que la recombinación implica el corte y la posterior fusión de las moléculas de DNA.

fuerza la noción de que la recombinación genética en células eucarióticas, como en las procarióticas, implica el corte e intercambio de DNA. Estos experimentos mostraron también que la mayoría de los intercambios de DNA tienen lugar entre cromosomas homólogos, más que entre las dos cromátidas hijas de un cromosoma dado. Esta selectividad es importante ya que asegura el intercambio de los genes entre los cromosomas paternos y maternos.

La recombinación homóloga puede producir conversión génica

La conclusión de que la recombinación homóloga se basa en el corte e intercambio de DNA no da por sí misma mu-

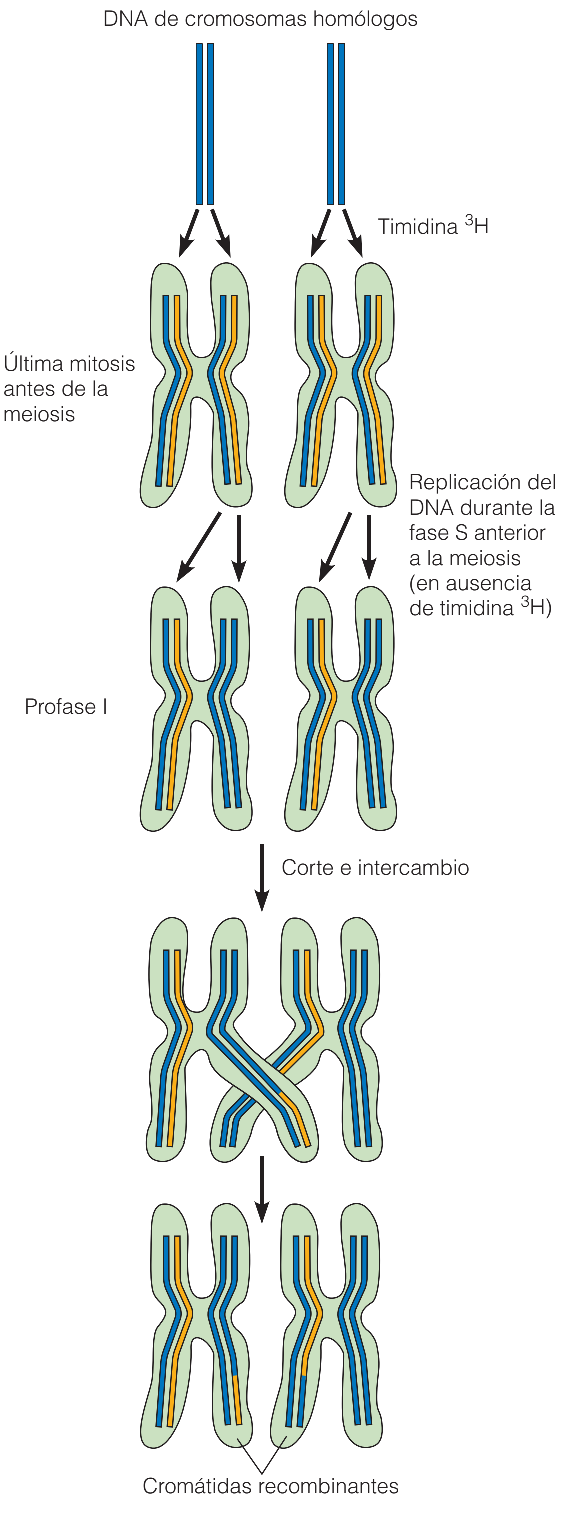


Figura 20.23 Demostración experimental del corte e intercambio durante la recombinación eucariótica. En este experimento, el DNA se marcó radiactivamente por una breve exposición de las células eucarióticas a timidina ^{3}H antes de la última mitosis anterior a la meiosis. Cuando se empleó la autorradiografía para examinar las cromátidas durante la meiosis, se vio que algunas contenían una mezcla de segmentos marcados (naranja) y no marcados (azul oscuro) como se había pronosticado por el modelo de corte e intercambio.

cha información concerniente a los mecanismos moleculares subyacentes. Uno de los modelos de rotura e intercambio más simple que puede imaginarse implicaría el corte de dos moléculas homólogas de DNA de doble cadena en posiciones comparables, seguido del intercambio y empalme de los extremos cortados. Este modelo implica que la recombinación genética debe ser completamente recíproca; es decir, todos los genes intercambiados de un cromosoma deben aparecer en el otro cromosoma, y viceversa. Por ejemplo, consideremos una situación hipotética que implique a dos genes designados como *P* y *Q*. Si un cromosoma contiene formas de esos genes llamadas *P1* y *Q1*, y el otro cromosoma tiene formas alternativas designadas como *P2* y *Q2*, sería esperable que el intercambio recíproco generase un cromosoma con los genes *P1* y *Q2*, y un segundo cromosoma con los genes *P2* y *Q1*.

Aunque este patrón recíproco se observa normalmente, se ha encontrado que en algunas situaciones la recombinación no es recíproca. Por ejemplo, la recombinación podría generar un cromosoma con los genes *P1* y *Q2*, y un segundo cromosoma con los genes *P2* y *Q2*. En este ejemplo concreto, el gen *Q1* que esperábamos encontrar en el segundo cromosoma parece haber sido convertido en un gen *Q2*. Por esta razón, la recombinación no recíproca se denomina con frecuencia **conversión génica**. La conversión génica se observa más comúnmente cuando los genes recombinantes están situados uno muy cerca de otro. Puesto que la recombinación entre genes muy próximos es un suceso raro, la conversión génica se detecta más fácilmente en organismos que se reproducen rápidamente y generan gran número de descendientes, como la levadura, y el moho común del pan, *Neurospora*.

Neurospora es un organismo especialmente apropiado para estudiar la conversión génica, debido a que sus células meióticas están confinadas en un pequeño saco, denominado **asca** que impide que las células se desplacen y por tanto permite seguir con facilidad la descendencia de cada célula (Figura 20.24). Inicialmente cada asca contiene una única célula diploide. La división meiótica de esta célula produce cuatro células haploides que posteriormente se dividen por mitosis, dando lugar al final a un total de ocho células. Puesto que la división final es mitótica, debería producir dos células hijas idénticas por cada célula que se divide. Sin embargo, en un número significativo de casos, esta mitosis produce dos células diferentes genéticamente. Estos resultados inesperados se observan con mayor frecuencia en genes que están cerca de un sitio de recombinación genética.

¿Cómo puede la mitosis producir dos células diferentes genéticamente? La explicación más directa es que un cromosoma contiene uno o más genes en los que las dos cadenas de la doble hélice de DNA no son completamente complementarias. Cuando las dos cadenas de DNA en esta región no complementaria se separan y sirven como moldes para la replicación del DNA, las dos nuevas moléculas de DNA en formación tendrán secuencias de bases ligeramente diferentes en esa región y por tanto representarán genes ligeramente diferentes.

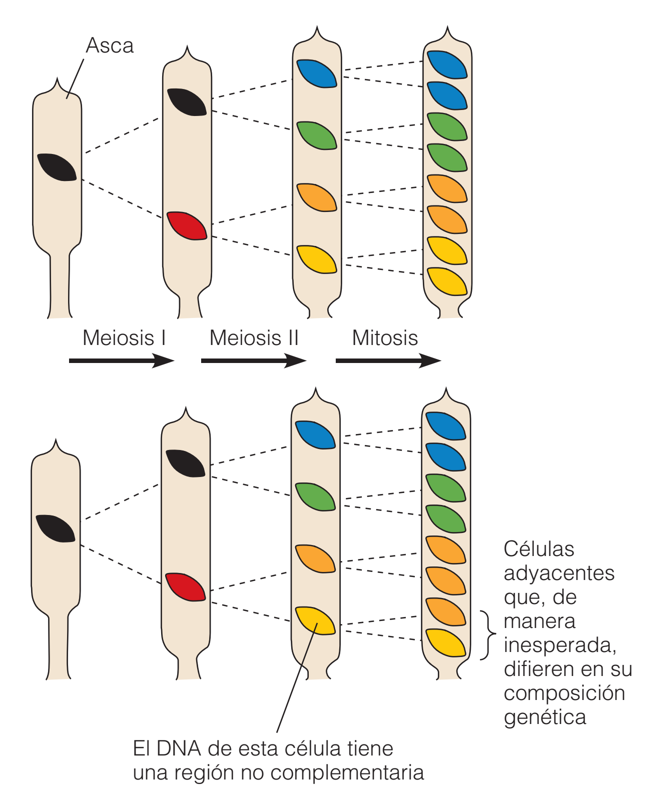


Figura 20.24 **Meiosis en neurospora.** En el moho del pan *Neurospora*, las células que se están dividiendo por meiosis están en el interior de un saco denominado asca. El asca mantiene a las células individuales alineadas en hileras, haciendo más fácil localizar cada linaje celular. La separación de los cromosomas homólogos durante la meiosis I, genera dos células que muestran caracteres genéticos diferentes. Las células que se producen durante la meiosis II, pueden diferir genéticamente unas de otras debido al sobrecruzamiento que se ha producido durante la meiosis I. La tercera división es una mitosis simple de la que se espera, por tanto, que produzca un par de células genéticamente idénticas por cada célula que se divide (arriba). Sin embargo, en ocasiones, esta mitosis terminal genera un par de células no idénticas (abajo).

La recombinación homóloga se inicia por intercambios de cadenas sencillas de DNA (uniones de holliday)

Las observaciones precedentes sugieren que la recombinación homóloga es más complicada de lo que se explica con un simple modelo de corte y empalme en el que el sobrecruzamiento se realiza rompiendo dos moléculas de DNA de doble cadena e intercambiando y empalmando los extremos cortados. Robin Holliday fue el primero en proponer la idea alternativa de que la recombinación está basada en el intercambio de cadenas sencillas de DNA entre dos moléculas de DNA de doble cadena. En la Figura 20.25 se ilustra un modelo actual de cómo conducirían tales intercambios de cadenas sencillas a la recombinación genética.

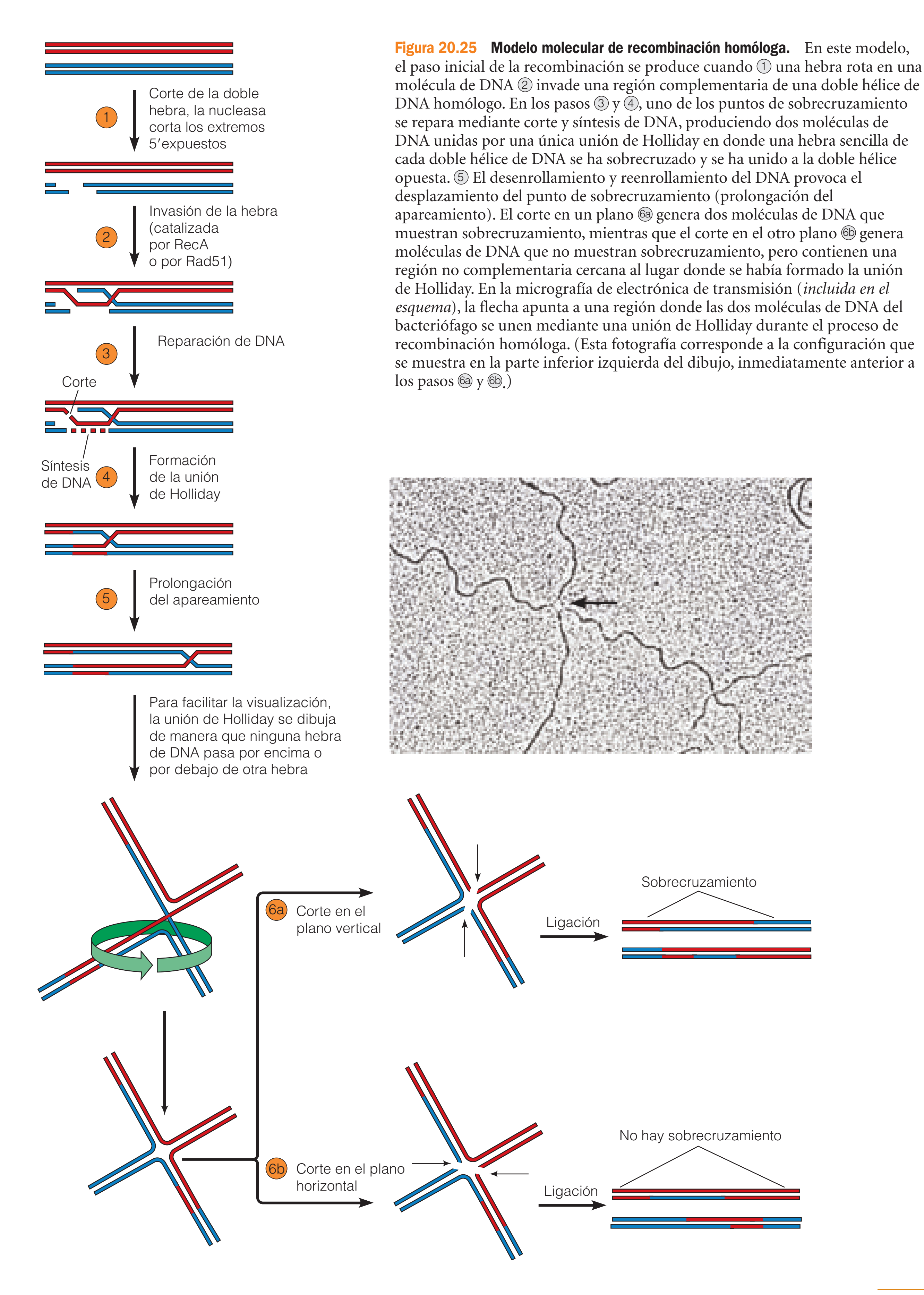


Figura 20.25 Modelo molecular de recombinación homóloga. En este modelo, el paso inicial de la recombinación se produce cuando ① una hebra rota en una molécula de DNA ② invade una región complementaria de una doble hélice de DNA homólogo. En los pasos ③ y ④, uno de los puntos de sobrecruzamiento se repara mediante corte y síntesis de DNA, produciendo dos moléculas de DNA unidas por una única unión de Holliday en donde una hebra sencilla de cada doble hélice de DNA se ha sobrecruzado y se ha unido a la doble hélice opuesta. ⑤ El desenrollamiento y reenrollamiento del DNA provoca el desplazamiento del punto de sobrecruzamiento (prolongación del apareamiento). El corte en un plano ⑥a genera dos moléculas de DNA que muestran sobrecruzamiento, mientras que el corte en el otro plano ⑥b genera moléculas de DNA que no muestran sobrecruzamiento, pero contienen una región no complementaria cercana al lugar donde se había formado la unión de Holliday. En la micrografía de electrónica de transmisión (*incluida en el esquema*), la flecha apunta a una región donde las dos moléculas de DNA del bacteriófago se unen mediante una unión de Holliday durante el proceso de recombinación homóloga. (Esta fotografía corresponde a la configuración que se muestra en la parte inferior izquierda del dibujo, inmediatamente anterior a los pasos ⑥a y ⑥b.)

De acuerdo con este modelo, el paso inicial ① de la recombinación es la ruptura de una o de ambas cadenas de la doble hélice de DNA. En cada caso, una única cadena de DNA rota derivada de una molécula de DNA «invade» una región complementaria de una doble hélice de DNA homólogo, desplazando a una de las dos hebras (② en la Figura 20.25). La síntesis localizada de DNA y la reparación final ③ y ④ generan una estructura en cruz, denominada una **unión de Holliday**, en la que una cadena sencilla de cada doble hélice de DNA se ha cruzado sobre la doble hélice opuesta y se ha unido a ella. La microscopía electrónica apoya directamente la existencia de las uniones de Holliday, revelando la presencia de dobles hélices de DNA unidas por sobrecruzamientos de cadena sencilla en sitios de recombinación genética (Figura 20.25, *imagen insertada*).

Una vez que la unión de Holliday se ha formado, el desenrollamiento y el re-enrollamiento de las dobles hélices de DNA provoca que el punto de sobrecruzamiento se desplace hacia atrás y hacia adelante a lo largo del DNA cromosómico ⑤. Este fenómeno, denominado *prolongación del apareamiento,* puede aumentar rápidamente la longitud del DNA de cadena sencilla que se intercambia entre dos moléculas de DNA. Después de que haya ocurrido la prolongación del apareamiento, la unión de Holliday se rompe y las hebras rotas de DNA se vuelven a unir para producir dos moléculas de DNA separadas. Hay dos maneras en las que la unión de Holliday se puede romper y volver a unir. Si se rompe en un plano, las dos moléculas de DNA que se producen mostrarán sobrecruzamiento; es decir, el DNA cromosómico más allá del punto donde se ha producido la recombinación se habrá intercambiado por completo entre los dos cromosomas ⑥a. Si la unión de Holliday se corta en el otro plano, no se produce el sobrecruzamiento pero las moléculas de DNA muestran una región no complementaria cercana al sitio donde se ha formado la unión de Holliday ⑥b.

¿Cuál es el destino de estas regiones no complementarias? Si se mantienen intactas, una sucesión de divisiones mitóticas separará las hebras de DNA que no se complementan y cada una servirá como molde para la síntesis de una nueva hebra complementaria. El resultado neto serán dos nuevas moléculas de DNA con secuencias de bases que difieren, y por tanto, dos células que contienen secuencias génicas ligeramente diferentes en las regiones afectadas. Ésta es la situación que se observa de vez en cuando en *Neurospora*, donde durante la mitosis que sigue a la meiosis, pueden surgir dos células diferentes genéticamente (Figura 20.24). Si no, una región de DNA no complementaria se puede corregir por excisión y reparación. El efecto neto de la reparación del DNA sería convertir a los genes de una forma a otra —en otras palabras, conversión génica—.

Una enzima clave implicada en la recombinación homóloga se identificó por primera vez utilizando extractos bacterianos que catalizan la formación de las uniones de Holliday. Tales extractos contienen una proteína, denominada *RecA*, cuya presencia es necesaria para la recombinación. Las bacterias mutantes que producen una proteína *RecA* defectuosa no pueden realizar la recombinación genética, ni tampoco pueden los extractos preparados de células capaces de crear las uniones de Holliday a partir de moléculas de DNA homólogo. La proteína *RecA* cataliza una reacción de «invasión de la hebra» en la que un segmento de DNA de cadena sencilla desplaza a una de las dos hebras de una doble hélice de DNA; en otras palabras, cataliza el paso ② de la Figura 20.25. Los eucariotas contienen una proteína comparable llamada *Rad51.* Para catalizar la reacción de invasión de la hebra, *RecA* o *Rad51* cubren primero la región de DNA de cadena sencilla; el DNA de cadena sencilla cubierto interactúa con un DNA de doble hélice moviéndose a lo largo del DNA blanco, hasta que alcanza una secuencia complementaria con la que se aparea.

Además de estar implicada en la recombinación genética, la invasión de la hebra desempeña también un papel en ciertos tipos de reparación del DNA. Como se mencionó en el Capítulo 19, los cortes en la doble hebra del DNA, con frecuencia se reparan por un proceso que aprovecha el hecho de que un cromosoma sufra un corte en la doble hebra. La molécula de DNA intacta del cromosoma homólogo puede servir como molde para guiar la reparación del cromosoma roto. En tales casos, las hebras de DNA de cadena sencilla procedentes de la molécula rota de DNA invaden la molécula de DNA intacto y encuentran una región complementaria que sirve como molde para reparar el DNA roto, justo lo que ocurre en el paso ② de la Figura 20.25.

El complejo sinaptonémico facilita la recombinación homóloga durante la meiosis

Al principio del capítulo, aprendimos que durante la profase I de la meiosis, los cromosomas homólogos se mantienen juntos por una estructura proteica, parecida a una cremallera, denominada complejo sinaptonémico. Numerosas observaciones sugieren que esta estructura desempeña un papel importante en la recombinación genética. Primero, el complejo sinaptonémico aparece en el momento en el que tiene lugar la recombinación. Segundo, su localización entre cromosomas homólogos opuestos se corresponde con la región donde se produce el sobrecruzamiento. Y finalmente, los complejos sinaptonémicos están ausentes en organismos que no realizan una recombinación meiótica como son los machos de las moscas de la fruta.

Presumiblemente, el complejo sinaptonémico facilita la recombinación manteniendo un emparejamiento estrecho entre cromosomas homólogos adyacentes a lo largo de su longitud. Si el complejo sinaptonémico funciona para facilitar la recombinación, ¿cómo se aseguran las células de que estas estructuras se formen sólo entre cromosomas homólogos? Observaciones recientes sugieren la existencia de un

proceso denominado *búsqueda de homología*, en donde un corte de cadena sencilla en la molécula de DNA produce una hebra libre que «invade» otra doble hélice de DNA y comprueba la presencia de secuencias complementarias (*véase* paso ② de la Figura 20.25). Si no se encuentra una zona de homología extensa, la hebra de DNA libre invade otra molécula de DNA y comprueba su complementariedad, repitiendo el proceso hasta que encuentra una molécula de DNA homóloga. Sólo entonces se desarrolla el complejo sinaptonémico, manteniendo a los cromosomas homólogos juntos en toda su longitud, para facilitar el proceso de recombinación.

Tecnología de DNA recombinante y clonaje de genes

En la naturaleza, la recombinación genética normalmente tiene lugar entre dos moléculas de DNA derivadas de organismos de la misma especie. En animales y plantas, por ejemplo, los dos padres de un individuo son las fuentes originales del DNA que se recombina durante la meiosis. Una molécula de DNA recombinante que surge de forma natural difiere de las moléculas de DNA parental sólo en la combinación de alelos que contiene; la identidad fundamental y la secuencia de sus genes se mantienen igual.

En el laboratorio no existen tales limitaciones. Desde el desarrollo de la **tecnología del DNA recombinante** en los años 70, los científicos han tenido a su disposición una colección de técnicas para fabricar DNA recombinante en el laboratorio. Ahora se puede escindir cualquier segmento de DNA de cualquier genoma y empalmarse con cualquier otro fragmento de DNA. Estas técnicas que inicialmente derivaron de la investigación básica en la biología molecular de las bacterias, han permitido a los investigadores aislar y estudiar genes tanto de procariotas como de eucariotas con mayor facilidad y precisión de lo que nunca antes se había pensado que fuera posible.

Una característica clave de la tecnología del DNA recombinante es la capacidad de replicar —o *clonar*— fragmentos específicos de DNA con el propósito de preparar grandes cantidades para investigación y para otros usos. El clonaje va acompañado del corte y empalme del DNA de interés y el empalme al DNA del elemento genético, llamado **vector de clonaje**, que se puede replicar de forma autónoma cuando se introduce *en una célula que crece en cultivo —en la mayoría de los casos, una bacteria como E.* Coli—. El vector de clonaje puede ser un plásmido o el DNA de un virus, normalmente un bacteriófago. En cualquier caso, el DNA «pasajero» del vector se copia cada vez que se replica éste. De esta forma, es posible generar grandes cantidades de genes específicos u otros segmentos de DNA —y también sus productos proteicos—, si los genes pasajeros se transcriben y se traducen en células en proliferación que portan el vector.

Para apreciar la importancia de la tecnología del DNA recombinante, necesitamos comprender la magnitud del problema al que los biólogos hacen frente cuando intentan estudiar el genoma de los organismos eucarióticos. La mayoría de nuestros conocimientos previos sobre el flujo de información en las células procede de estudios realizados en bacterias y virus, de cuyos genomas se han construido mapas que se han analizado en gran detalle utilizando métodos genéticos que no eran fácilmente aplicables a los eucariotas. Hasta hace unas pocas décadas, los investigadores se desesperaban por no ser capaces de entender y manipular genomas eucariotas en la misma medida, debido a que un eucariota típico tiene por lo menos 10.000 veces más de DNA que los fagos mejor estudiados —verdaderamente un gigantesco pajar en donde encontrar una aguja del tamaño de un gen—. Pero el advenimiento de la tecnología del DNA recombinante ha hecho posible aislar genes eucariotas individualizados en grandes cantidades, suficientes como para permitir que sean estudiadas en su totalidad anunciando una nueva era en la Biología.

El descubrimiento de las enzimas de restricción prepara el terreno para la tecnología del DNA recombinante

La mayoría de lo que denominamos tecnología del DNA recombinante ha sido posible por el descubrimiento de las *enzimas de restricción* (Anexo 18B). La capacidad de las enzimas de restricción para cortar moléculas de DNA en secuencias específicas, denominadas *sitios de restricción* las convierte en poderosas herramientas para cortar grandes moléculas de DNA en fragmentos más pequeños que se pueden recombinar de formas diferentes. Las enzimas de restricción que hacen cortes escalonados en el DNA son especialmente útiles, puesto que generan *extremos adhesivos* de cadena sencilla (también llamados *extremos cohesivos*) que permiten unir, de manera sencilla, fragmentos de DNA obtenidos de diferentes fuentes. En esencia, dos fragmentos cualesquiera generados por la misma enzima de restricción pueden unirse mediante el emparejamiento de secuencias de bases complementarias entre sus extremos cohesivos de cadena sencilla.

La Figura 20.26 ilustra cómo funciona este mecanismo de aproximación general. Primero, las dos moléculas de DNA de las dos fuentes se tratan con una enzima de restricción de la que se sabe que genera fragmentos con extremos cohesivos ①, entonces, los fragmentos se mezclan en unas condiciones que favorecen el emparejamiento de las bases de los extremos cohesivos ②. Una vez que se unen de esta forma, los fragmentos de DNA se sellan covalentemente por medio de una DNA ligasa, ③ una enzima que normalmente está implicada en la replicación y reparación del DNA (*véase* Capítulo 19). El producto final es una **molécula de DNA recombinante** que contiene secuencias de DNA derivada de fuentes diferentes.

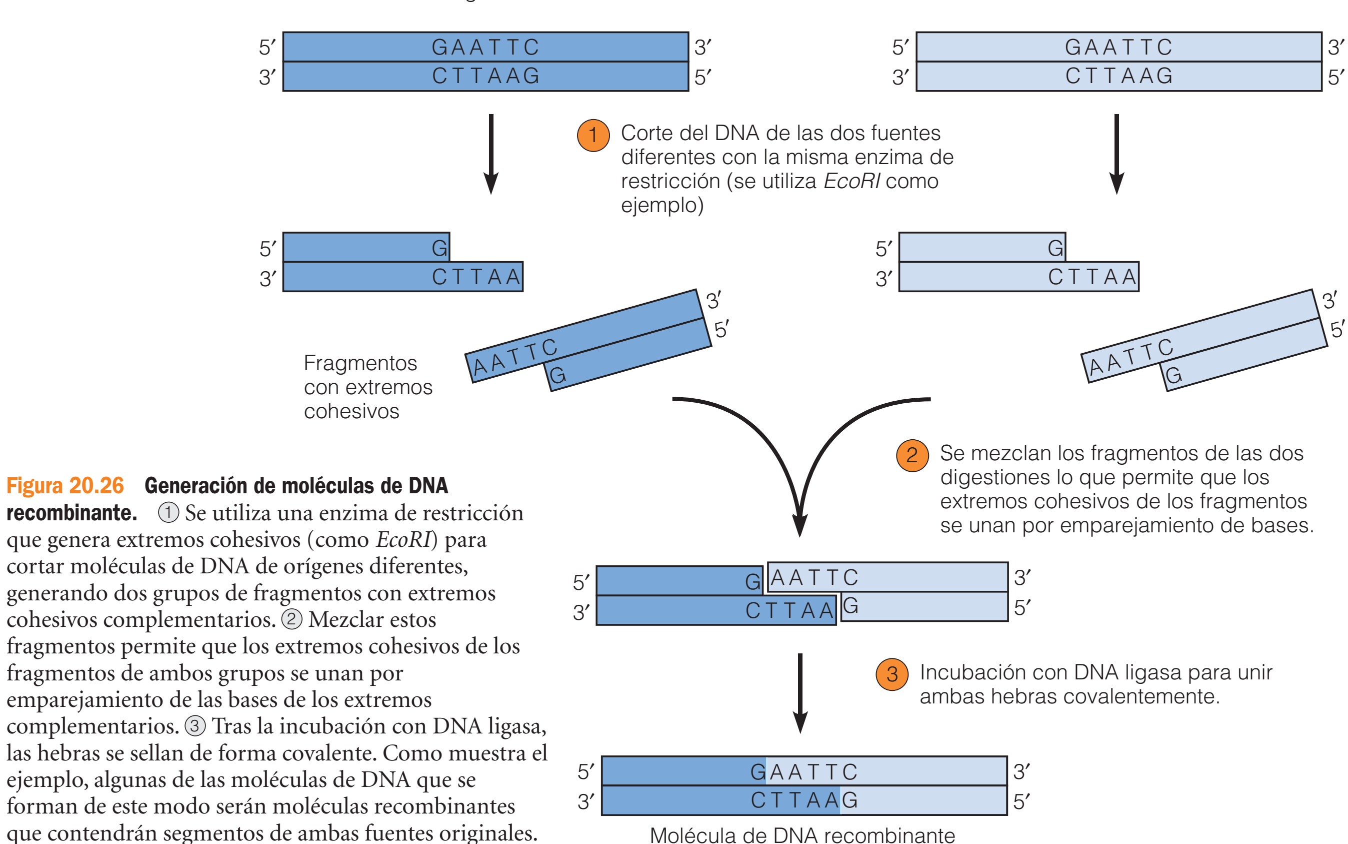


Figura 20.26 Generación de moléculas de DNA recombinante. ① Se utiliza una enzima de restricción que genera extremos cohesivos (como *EcoRI*) para cortar moléculas de DNA de orígenes diferentes, generando dos grupos de fragmentos con extremos cohesivos complementarios. ② Mezclar estos fragmentos permite que los extremos cohesivos de los fragmentos de ambos grupos se unan por emparejamiento de las bases de los extremos complementarios. ③ Tras la incubación con DNA ligasa, las hebras se sellan de forma covalente. Como muestra el ejemplo, algunas de las moléculas de DNA que se forman de este modo serán moléculas recombinantes que contendrán segmentos de ambas fuentes originales.

El uso combinado de las enzimas de restricción y la DNA ligasa permite que dos o más moléculas de un DNA cualquiera, se corten y empalmen juntas, independientemente de sus orígenes. Un fragmento de DNA humano, se puede unir al DNA de un fago o de una bacteria tan fácilmente como se ligaría a cualquier otro fragmento de DNA humano. En otras palabras, es posible formar moléculas de DNA recombinante que nunca existieron en la naturaleza, sin tener en cuenta las barreras naturales que, de lo contrario, limitarían la recombinación genética a genomas de la misma especie o de especies estrechamente relacionadas. Es ahí donde radica el poder (y, para algunos, la inquietud) de la tecnología del DNA recombinante.

Las técnicas de clonaje de DNA permiten producir grandes cantidades de secuencias individuales de genes

El poder de las enzimas de restricción, es la facilidad con la que permiten insertar el segmento deseado de DNA, normalmente un segmento que contiene un gen específico, en un vector de clonaje que se puede replicar cuando se introduce en las células bacterianas. Suponga, por ejemplo, que quiere aislar un gen que codifica un producto útil en medicina, como la insulina que se necesita para el tratamiento de los diabéticos o los factores de coagulación necesarios para los pacientes con hemofilia. Utilizando las enzimas de restricción para insertar el DNA que contiene tales genes, en un vector de clonaje en bacterias y después, identificando las bacterias que contienen el DNA de interés, es posible hacer crecer grandes cantidades de estas células y, por tanto, obtener grandes cantidades del DNA deseado (y por tanto de su producto proteico). Este proceso de generar muchas copias de fragmentos específicos de DNA se denomina **clonaje de DNA**. (En Biología, un *clon* es una población de organismos que derivan de un único antecesor y que por tanto son homogéneos genéticamente, y un *clon celular* es una población de células que derivan de la división de una única célula. Por analogía, un *clon de DNA*, es una población de moléculas de DNA que derivan de la replicación de una única molécula y que por tanto son idénticas unas a otras).

Aunque los detalles específicos del procedimiento de clonaje de DNA varían de manera habitual, están implicados los cinco pasos siguientes: (1) inserción de DNA en un vector de clonaje; introducción de un vector recombinante en células en cultivo, normalmente bacterias; (3) amplificación del vector recombinante en la bacteria; (4) selección de las células que contienen el DNA recombinante; y (5) identificación de los clones que contienen el DNA de interés. La Figura 20.27 proporciona una visión de conjunto de estos acontecimientos utilizando un vector de clonaje bacteriano. Consulte esta figura según se describe cada paso.

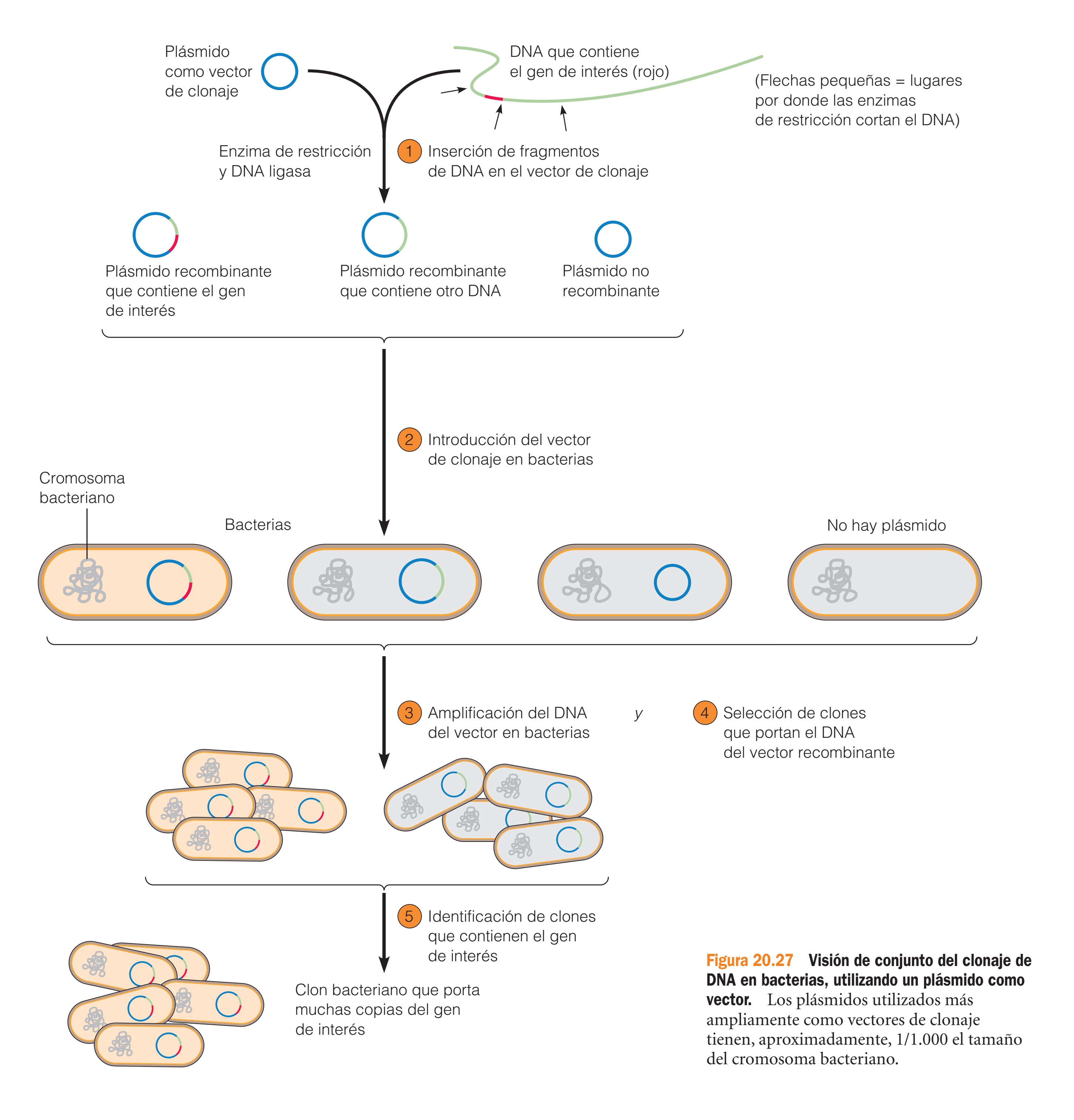
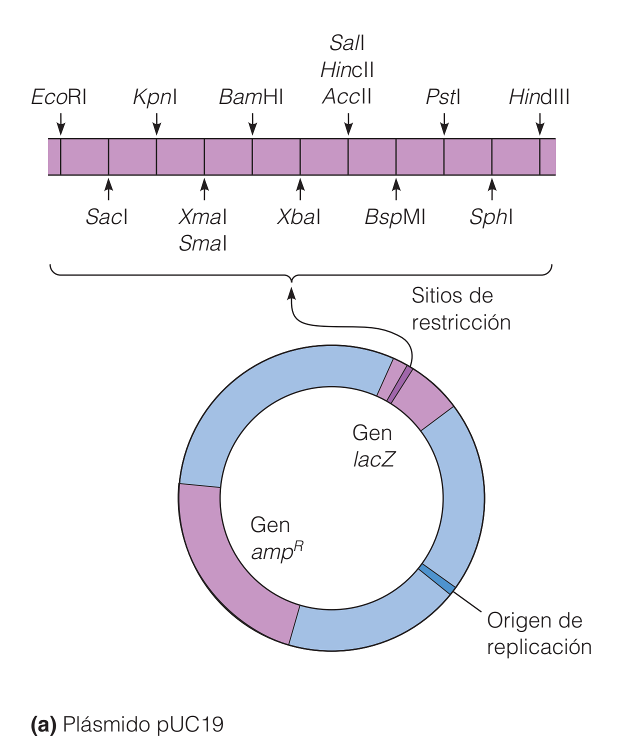


Figura 20.27 Visión de conjunto del clonaje de DNA en bacterias, utilizando un plásmido como vector. Los plásmidos utilizados más ampliamente como vectores de clonaje tienen, aproximadamente, 1/1.000 el tamaño del cromosoma bacteriano.

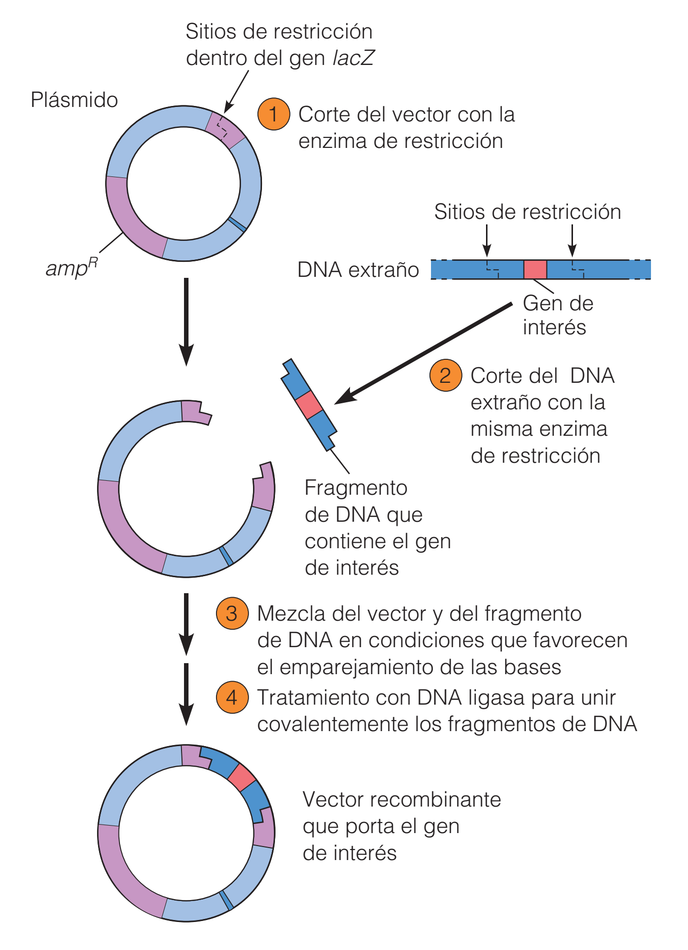
1. Inserción del DNA en un vector de clonaje. El primer paso en el clonaje de un fragmento de DNA dado, es su inserción en un vector de clonaje apropiado, normalmente un bacteriófago o un plásmido. La mayoría de los vectores utilizados para el clonaje de DNA son también moléculas de DNA recombinantes, diseñadas específicamente para este propósito. Por ejemplo, cuando el DNA del bacteriófago λ se utiliza como vector de clonaje, al DNA del fago se le han quitado alguno de sus genes no esenciales para dejar espacio en la cabeza del fago para cortar y empalmar DNA. Los plásmidos utilizados como vectores de clonaje, normalmente tienen gran variedad de sitios de restricción y con frecuencia portan genes que confieren resistencia a los antibióticos a sus células huésped. Los genes de resistencia a antibióticos facilitan la etapa de selección ④, mientras que la presencia de múltiples sitios de restricción, le permite al plásmido incorporar fragmentos de DNA preparados con variedades distintas de enzimas de restricción.

Un ejemplo de un plásmido utilizado de manera habitual como vector es pUC19 («puck-19»), que se muestra de forma esquemática en la Figura 20.28a: puesto que el plásmido porta un gen que confiere resistencia al antibiótico ampicilina (*amp*^{R}), las bacterias que contienen el plásmido pueden ser fácilmente identificadas por su capacidad para crecer en presencia de ampicilina. El plásmido pUC19 también tiene 11 sitios de restricción diferentes agrupados en una región del plásmido que contiene el gen *lacZ*, que codifica la enzima β-galactosidasa. La integración de un DNA extraño en cualquiera de estos sitios de restricción cortará el gen *lacZ*, bloqueando así la producción de β-galactosidasa. Como veremos en breve, esta interrupción en la producción de β-galactosidasa se utilizará posteriormente en el proceso de clonaje para detectar la presencia de plásmidos que contienen el DNA extraño.

La Figura 20.28b ilustra cómo un gen de interés concreto, que reside en una fuente de DNA extraño, se inserta en un vector de clonaje plasmídico utilizando pUC19 como vector y una enzima de restricción que rompe pUC19 en un único punto en el gen l*acZ*. La incubación con la enzima de restricción corta el plásmido en ese sitio ①, hace al DNA lineal (abriendo el círculo). La misma enzima de restricción se utiliza para cortar la molécula de DNA que contiene el gen que se va a clonar ②. Los fragmentos de DNA extraño con extremos cohesivos se incuban con las moléculas de



(a) Plásmido pUC19



(b) Preparación de un plásmido como vector recombinante

Figura 20.28 Clonaje de un gen usando como vector el plásmido pUC19. (**a**) pUC19 es un plásmido de *E. coli* de 2.686 pares de bases que contiene un origen de replicación, un gen de resistencia a ampicilina (*amp*^{R}) y un gen *lacZ* que codifica la β-galactosidasa. Dentro del gen *lacZ* se agrupan 11 sitios de restricción diferentes. (**b**) Inserción del DNA extraño en el plásmido. ① El plásmido se corta con una enzima de restricción de la que se sabe que reconoce un único sitio, en este caso, uno que está dentro del gen *lacZ*. ② La misma enzima se utiliza para cortar una molécula de DNA extraño que contiene el gen de interés, generando fragmentos que tienen los mismos extremos cohesivos que el DNA del plásmido linealizado. ③ Entonces, los fragmentos de DNA extraño, se incuban con el DNA del plásmido linealizado en condiciones que favorecen el emparejamiento de las bases de los extremos cohesivos. Entre los productos esperados habrá moléculas de plásmido recircularizado por emparejamiento de bases, que contendrán un único fragmento de DNA extraño; algunos de estos contendrán el gen de interés. ④ La incubación con DNA ligasa sella covalentemente tales moléculas recombinantes, generando un vector plasmídico recombinante que porta el gen de interés. Las células que portan tales plásmidos serán resistentes a ampicilina y no producirán β-galactosidasa debido al DNA extraño insertado dentro del gen *lacZ*.

vector linealizado en condiciones que favorecen el emparejamiento de las bases ③, seguido del tratamiento con DNA ligasa que une a las moléculas covalentemente ④. Para hacer el diagrama más simple, la Figura 20.28 muestra solamente el plásmido recombinante que contiene el fragmento deseado de DNA extraño. Sin embargo, en la práctica estarán presentes gran variedad de productos de DNA incluyendo plásmidos no recombinantes y plásmidos recombinantes que contienen otros fragmentos generados por la acción de la enzima de restricción.

2. Introducción del vector recombinante en las células bacterianas. Una vez que el DNA extraño se ha insertado en un vector de clonaje, el vector recombinante resultante se replica al introducirlo en una célula huésped apropiada, normalmente la bacteria *E. coli*. Los vectores de clonaje se introducen en las bacterias de una de estas dos formas. Si el vector de clonaje es el DNA de un fago, se incorporará a las partículas del fago que posteriormente se utilizarán para infectar a la población celular apropiada. Por otro lado, los plásmidos, simplemente, se introducen en el medio que rodea a las células blanco. Tanto las células procariotas como las eucariotas captarán el DNA plasmídico del medio externo, aunque normalmente se necesitan tratamientos especiales para aumentar la eficiencia del proceso. La adición de iones calcio, por ejemplo, aumenta claramente la velocidad a la que las células captan el DNA del medio externo.

3. Amplificación del vector recombinante en bacterias. Después de que hayan captado el vector de clonaje recombinante, la bacteria huésped se pasa a una placa con medio nutritivo de forma que el DNA del vector recombinante se pueda replicar o *amplificar*. En el caso de un vector plasmídico, las bacterias proliferan y forman colonias, cada una de ellas derivada de una única célula. En condiciones favorables, *E. coli* se dividirá cada 22 minutos dando lugar a un billón de células en menos de 11 horas. A medida que las bacterias se multiplican, los plásmidos recombinantes también se replican, produciendo un número enorme de moléculas de vector que contienen fragmentos de DNA extraño. En estas condiciones, un único plásmido recombinante introducido en una célula se amplificará varios cientos de billones de veces en menos de medio día.

En el caso de los fagos como vectores, tales como el fago λ, se utiliza un procedimiento ligeramente diferente. Las partículas de fago que contienen DNA recombinante se mezclan con células bacterianas y la mezcla se coloca en un medio de cultivo en condiciones que produzcan un «tapiz» continuo de bacterias en la placa. Cada vez que una partícula de fago infecta a una célula, el fago se replica y finalmente ocasiona la ruptura y muerte celular. Las partículas de fago liberadas pueden infectar a células vecinas, repitiendo otra vez el proceso. Este ciclo finalmente produce una zona clara de bacterias muertas llamada **placa**, que contiene un gran número de partículas replicadas de fago derivadas de la replicación de un único tipo de fago recombinante (*véase* Figura 18A.3). Los millones de partículas de fago de cada placa contienen moléculas idénticas de DNA de fago recombinante.

4. Selección de células que contienen DNA recombinante. Durante la amplificación del vector de clonaje se introducen procedimientos que seleccionan preferentemente el crecimiento de aquellas células que han incorporado el vector con éxito. Para vectores plasmídicos como el pUC19, el método de selección se basa en los genes de resistencia a antibióticos del plásmido. Por ejemplo, todas las bacterias que portan los plásmidos recombinantes generados en la Figura 20.28b serán resistentes al antibiótico ampicilina, ya que todos los plásmidos tienen un gen de resistencia a ampicilina intacto. El gen amp^R es un **marcador de selección,** que sólo permite a las células portadoras de los plásmidos crecer en un medio de cultivo que contiene ampicilina (el medio «selecciona» el crecimiento de las células resistentes a la ampicilina).

Sin embargo, no todas las bacterias resistentes a ampicilina portarán plásmidos *recombinantes* —es decir, plásmidos que contienen el inserto de DNA—. Pero aquellas bacterias que contienen plásmidos recombinantes pueden identificarse fácilmente ya que el gen *lacZ* se ha interrumpido por el DNA extraño y, como resultado, no se puede seguir produciendo β-galactosidasa. La falta de β-galactosidasa se puede detectar por una simple prueba de coloración, en la que las bacterias son expuestas a un sustrato que es la β-galactosidasa que normalmente escinde dando lugar a un compuesto que tiñe de azul. Las colonias bacterianas que contienen el plásmido pUC19 normal se teñirán por tanto de azul, mientras que las colonias que tienen plásmidos recombinantes con fragmentos de DNA insertados aparecerán sin color.

Para el caso de los fagos como vectores de clonaje, se utiliza una aproximación diferente, ya que normalmente derivan de moléculas de DNA del fago λ que tienen sólo alrededor del 70% de la longitud del DNA del fago normal. El resultado es que, estas moléculas de DNA son demasiado pequeñas para ser empaquetadas en partículas de fago funcionales. Pero si se inserta un fragmento adicional de DNA en medio de tal vector de clonaje, se creará una molécula de DNA recombinante de mayor tamaño, y por tanto, susceptible de ensamblarse en un fago funcional (Figura 20.29). De ahí que cuando se emplean fagos como vectores de clonaje, las únicas partículas de fago que pueden infectar con éxito a bacterias son las que contienen una secuencia de DNA extraño insertada.

5. Identificación de los clones que contienen el DNA de interés. Los pasos precedentes generan normalmente un número enorme de bacterias que producen muchas clases diferentes de DNA recombinante, siendo sólo unos o unos pocos de ellos, relevantes para la aplicación deseada. En la

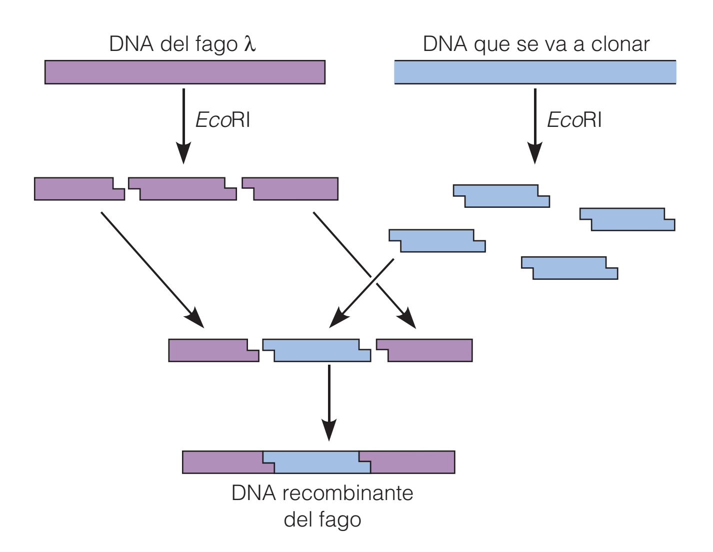


Figura 20.29 Bacteriófago λ como vector de clonaje. El segmento medio de la molécula de DNA del fago λ se elimina cortándolo con EcoRI y posteriormente sustituyéndolo por el fragmento de DNA que se va a clonar. Es necesario que el fragmento de DNA insertado haga que la molécula de DNA del fago λ sea lo suficientemente grande como para empaquetarla en una partícula de fago funcional.

Figura 20.27 por ejemplo, las colonias bacterianas presentes en las placas de Petri al final del paso ④ contienen, probablemente al menos, tantas clases diferentes de fragmentos como sitios de restricción tiene el DNA usado en el paso ①. El paso final, en cualquier procedimiento de DNA recombinante es, por tanto, hacer un proceso de selección de las colonias bacterianas (o placas de fago) para identificar las que contienen específicamente el fragmento de DNA de interés. Existen varias técnicas para el escrutinio de las colonias de bacterias. La técnica concreta a utilizar depende de lo que el investigador sepa sobre el gen que está clonando. Si se sabe algo sobre la secuencia de bases del gen de interés, el investigador puede emplear una **sonda de ácido nucleico**, una molécula de DNA monocatenario o de RNA que puede identificar, por apareamiento de bases, la secuencia de DNA deseada. Las sondas de ácido nucleico, se marcan con radiactividad o con algún otro grupo químico que permita que la sonda se visualice con facilidad. (En el Cuadro de texto 18C, vimos una sonda de este tipo usada para identificar bandas de fragmentos de restricción en Southern blotting.) El investigador prepara una sonda de DNA o de RNA marcada que contiene toda o parte de la secuencia de nucleótidos de interés y la usa para etiquetar las colonias que contienen DNA complementario. La Figura 20.30 resume cómo se puede usar esta *técnica de hibridación de colonias* para seleccionar colonias portadoras del DNA deseado. Una vez que se han identificado las colonias apropiadas, se recupera el DNA clonado en esas colonias mediante el aislamiento del DNA del vector de las bacterias y la digestión con la misma enzima de restricción usada inicialmente. Otra aproximación al proceso de selección se concentra en la proteína codificada por el gen de interés. Si esta proteína es conocida, y ha sido purificada, se pueden preparar anticuerpos contra ella y usarlos como sondas para comprobar la presencia de la proteína en las colonias bacterianas. Alternativamente, puede verificarse de alguna

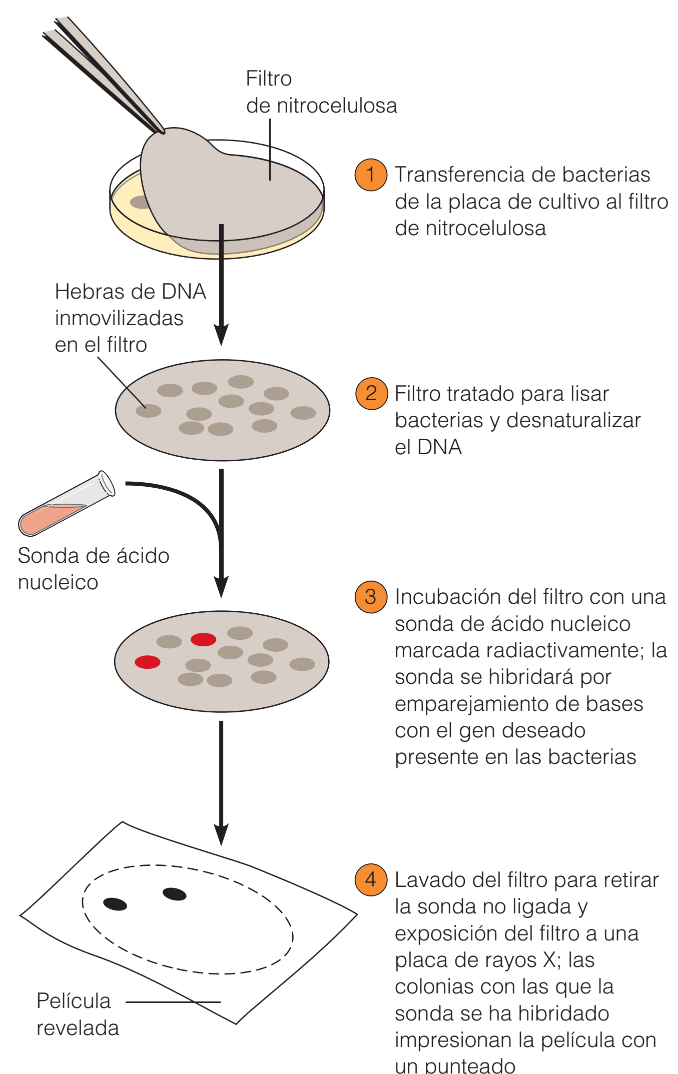


Figura 20.30 La técnica de hibridación de colonias. Esta técnica se utiliza para seleccionar las colonias bacterianas que presentan una secuencia de DNA complementaria a una sonda de ácido nucleico. ① Las colonias bacterianas se transfieren desde la superficie de una placa de cultivo con agar a un filtro de nitrocelulosa. ② El filtro se trata con detergente para lisar las bacterias y álcali (NaOH) para desnaturalizar su DNA. ③ Entonces, se incuban los filtros con moléculas de una sonda de ácido nucleico —DNA o RNA de cadena sencilla marcado radiactivamente— que se ancla por emparejamiento de bases a cualquier DNA presente en el filtro. ④ El filtro se aclara y se somete a autorradiografía, que hará visibles solo aquellas colonias que contienen el DNA que tiene la secuencia complementaria a la sonda. El emparejamiento de bases entre hebras de ácido nucleico de dos fuentes, tales como la sonda de ácido nucleico y el DNA diana del ejemplo, se denomina *hibridación de ácidos nucleicos*.

forma la *función* de la proteína; por ejemplo, en una enzima, puede evaluarse su actividad catalítica. Obviamente, los métodos para identificar proteínas dependen de la capacidad de la bacteria para producir una proteína extraña codificada por un gen clonado y fallarán al detectar genes clonados que no se expresen en la célula huésped. Sin embargo, se pueden utilizar *vectores de expresión* especiales para aumentar la probabilidad de que las bacterias transcriban los genes eucarióticos apropiadamente y en grandes cantidades. Los vectores de expresión contienen secuencias especiales de DNA que le indican a la bacteria que realice estos procesos.

Tanto las bibliotecas genómicas como las de cDNA son utiles para el clonaje de DNA

Actualmente, el clonaje de DNA extraño en bacterias es un procedimiento rutinario. En la práctica, con frecuencia, obtener una buena fuente de DNA como material inicial, es uno de los pasos más difíciles. Habitualmente se usan dos aproximaciones diferentes para obtener DNA como material inicial. En la aproximación «fragmentación al azar» se escinde el genoma completo de un organismo (o una parte sustancial de él), en un gran número de fragmentos de restricción que se insertan en vectores de clonaje para su posterior introducción en bacterias (o partículas de fago). El grupo de clones resultante se llama **biblioteca genómica** ya que contiene fragmentos clonados que representan la mayor parte del genoma, si no todo. Las bibliotecas genómicas de DNA eucariótico son fuentes valiosas de las que se pueden aislar genes específicos siempre que se disponga de una técnica de identificación suficientemente sensible. Una vez que se ha identificado una colonia bacteriana rara que contiene el fragmento de DNA deseado, se la puede cultivar en un medio nutritivo para generar tantas copias del fragmento como pudieran necesitarse. Por supuesto, los cortes del DNA realizados por la enzima de restricción no respetan los límites de los genes, y algunos genes podrían estar repartidos entre dos o más fragmentos de restricción. Se puede solventar este problema llevando a cabo una *digestión parcial del DNA* en la que se usa una pequeña cantidad de enzima de restricción durante un breve periodo de tiempo. En estas condiciones, algunos sitios de restricción permanecen sin cortar, aumentando la probabilidad de que al menos una copia intacta de cada gen esté presente en la biblioteca genómica.

La fuente alternativa de DNA para los experimentos de clonaje consiste en DNA que ha sido generado copiando RNA mensajero (mRNA) con la enzima *transcriptasa inversa*. Esta reacción genera una población de moléculas de **DNA complementario (cDNA)** cuya secuencia es complementaria a la del mRNA empleado como molde (Figura 20.31). Si se aísla la población completa de mRNA de una célula y se copia en cDNA para su clonaje, el grupo de clones resultante se llama **biblioteca de cDNA**. La ventaja de

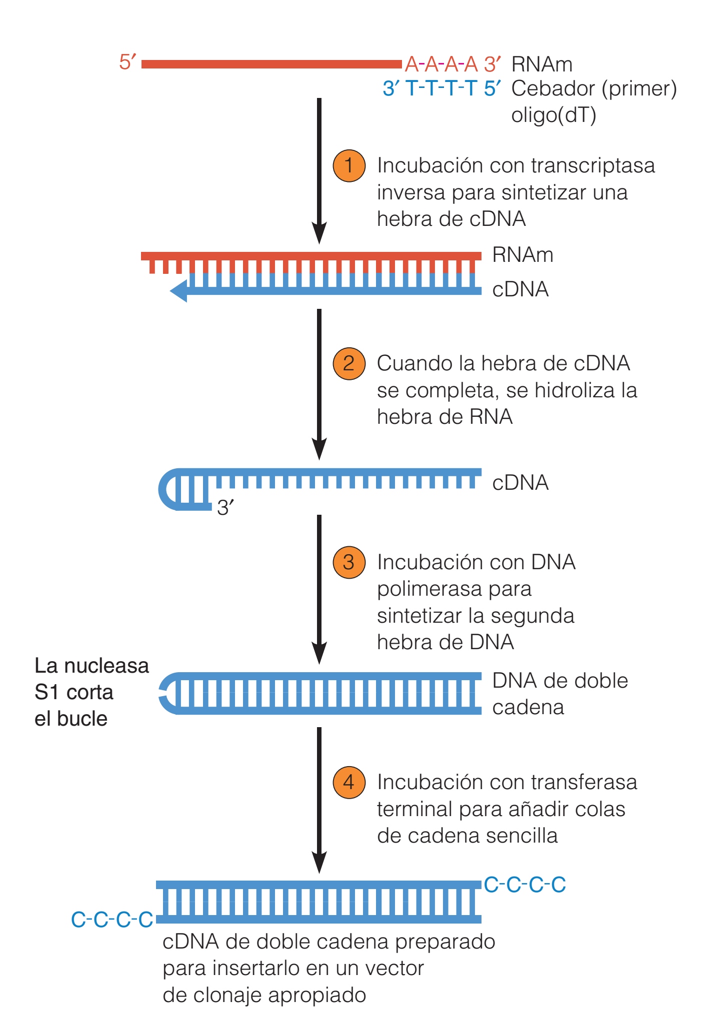


Figura 20.31 Preparación de DNA complementario (cDNA) para clonaje. ① El RNA mensajero se incuba con transcriptasa inversa que utiliza el mRNA como molde para sintetizar una hebra de DNA complementario (cDNA). Como cebador (primer) se puede utilizar una cadena corta de deoxinucleótidos de timina, Oligo(dT), ya que el RNAm eucariótico siempre tiene un tramo de nucleótidos de adenina en su extremo 3′. ② El híbrido mRNA-cDNA resultante se trata con álcali o con una enzima que hidroliza el RNA, dejando la cadena sencilla de cDNA. ③ La DNA polimerasa puede sintetizar ahora la hebra de DNA complementaria. El bucle alrededor del extremo 39 de la primera hebra de DNA se puede utilizar como cebador. Una enzima denominada nucleasa S1 se utiliza para cortar el bucle. ④ Para que se produzca una inserción eficaz en un vector de clonaje, el DNA de doble cadena debe tener colas de cadena sencilla que sean complementarias a las del vector. Se pueden añadir por incubación con una transferasa terminal, una enzima que añade, uno a uno, nucleótidos a los extremos de la molécula. Si se añaden al DNA tramos cortos de nucleótidos de citosina (C), y al mismo tiempo se añaden tramos cortos de nucleótidos de guanina (G) al vector de clonaje linealizado, se pueden generar moléculas recombinantes permitiendo a las colas C de cadena sencilla del cDNA, hibridar con las colas G de cadena sencilla del vector. (Una alternativa al paso ④ sería ligar moléculas sintéticas de un «ligador-linker», que contiene una gran variedad de sitios de restricción, tanto a los extremos del cDNA como a los de un vector de clonaje con extremos romos. Los linkers se cortarían, posteriormente, con una enzima de restricción que genere extremos cohesivos.)

una biblioteca de cDNA es que sólo contiene las secuencias de DNA que son transcritas a mRNA, presumiblemente los genes activos de las células o tejidos a partir de los que se preparó el mRNA.

Además de estar limitada a los genes transcritos, una biblioteca de cDNA tiene otra ventaja importante como punto de partida para el clonaje de genes eucarióticos. El uso de mRNA para obtener cDNA garantiza que los genes clonados sólo contengan secuencias codificadoras, sin las interrupciones no codificadoras llamadas *intrones* que son comunes en los genes eucarióticos (*véase* Capítulo 21). Los intrones pueden ser tan extensos que la longitud total del gen eucariótico se vuelve inmanejable para las técnicas de DNA recombinante. El uso de cDNA elimina este problema. Además, las bacterias no pueden sintetizar el producto proteico correcto de un gen eucariótico que contenga intrones, a menos que los intrones se hayan eliminado, como ocurre en el cDNA.

Grandes segmentos de DNA pueden clonarse en YACs y BACs

El clonaje de DNA que utiliza los vectores mencionados hasta ahora, es una metodología muy potente pero tiene una limitación importante. Los fragmentos de DNA extraño clonados en estos vectores no pueden superar una longitud de alrededor de 30.000 pares de bases (pb). Los genes eucarióticos son, a menudo, más grandes y, por tanto, no pueden clonarse intactos utilizando estos vectores. Para proyectos de mapeo genómico, es deseable disponer de clones que contengan extensiones de DNA mayores, dado que a más DNA por clon, se necesitará menos número de clones para cubrir el genoma completo.

Uno de los primeros avances en el clonaje de segmentos de DNA de gran tamaño fue el desarrollo de un vector llamado **cromosoma artificial de levadura** (**YAC**, del inglés *Yeast Artificial Chromosome*). Un YAC es un cromosoma eucariótico «minimalista» que contiene todas las secuencias de DNA necesarias para la replicación cromosómica normal, para la segregación a las células hijas, y poco más. Como podría adivinar por su conocimiento de la replicación y segregación cromosómica (*véase* Capítulo 19), un cromosoma eucariótico requiere tres tipos de secuencias de DNA: (1) un origen de la replicación de DNA; (2) dos telómeros que permitan la extensión periódica por la telomerasa de los extremos menguantes; (3) un centrómero para asegurar una fijación apropiada, vía cinetocoro a los microtúbulos del huso, durante la división celular. Si se combinan las versiones de la levadura de estos tres tipos de secuencias de DNA con un segmento de DNA extraño, el YAC resultante se replicará en la levadura y se segregará en las células hijas en cada ciclo de la división celular, igual que un cromosoma natural. En condiciones apropiadas, pueden expresarse sus genes extraños.

La Figura 20.32 resume la construcción de un YAC típico. Además de un origen de replicación (ORI), la secuencia del centrómero (CEN) y los dos telómeros (TEL), el vector ilustrado porta dos genes que sirven como marcadores selectivos, así como tres sitios de restricción. En los experimentos de clonaje, el vector y los DNA extraños se escinden con las enzimas de restricción apropiadas, se mezclan y se empalman con DNA ligasa. Los productos resultantes, que incluyen una variedad de YACs que portan fragmentos diferentes de DNA extraño, se introducen en células de levadura cuyas paredes celulares han sido eliminadas. La presencia de dos marcadores selectivos hace fácil seleccionar las células de levadura que contienen YACs con ambos «brazos cromosómicos». El diagrama de la figura no está hecho a escala: el vector YAC, en sí, tiene sólo alrededor de 10.000 pb, pero el DNA extraño insertado normalmente tiene de 300.000 a 1,5 millones de pb de longitud. De hecho, los YACs deben portar al menos 50.000 pb para ser replicados y segregados correctamente.

Otro tipo de vector utilizado para clonar grandes fragmentos de DNA es el **cromosoma artificial bacteriano** (**BAC**, del inglés *Bacterial Artificial Chromosome*), un derivado del plásmido *factor F*, que algunas bacterias emplean para transferir DNA durante la conjugación bacteriana. Los vectores BAC son formas modificadas del plásmido factor F, que pueden transportar hasta 350.000 pb de DNA extraño y que tienen todos los componentes necesarios para un vector de clonaje bacteriano, como los orígenes de replicación, los genes de resistencia a antibióticos y los sitios de inserción para DNA extraño. Un tipo de BAC facilita el proceso de selección de clones recombinantes incluyendo el gen *SacB* que convierte la sacarosa (azúcar de mesa) en una sustancia tóxica para las bacterias. Dentro del gen *SacB* se sitúa un sitio de clonaje BamHI, de forma que cuando se inserta en este sitio del vector BAC, DNA extraño, se rompe el gen *SacB*. Cuando este vector BAC se introduce en células bacterianas cultivadas en presencia de sacarosa, sólo podrán crecer las células que contienen moléculas del vector BAC con el inserto de DNA extraño. Las células que reciben un vector BAC sin inserto de DNA no podrán crecer ya que el gen *SacB* permanece intacto y produce una sustancia tóxica a partir de la sacarosa.

Ingeniería genética

La tecnología del DNA recombinante ha tenido un enorme impacto en el campo de la biología celular, llevándonos a nuevos detalles de la organización, comportamiento y regulación de los genes y de sus productos proteicos. La mayoría de estos descubrimientos habrían sido virtualmente inconcebibles en ausencia de estas poderosas técnicas de aislamiento de secuencias génicas. Los rápidos avances en nuestra capacidad para manipular genes también ha abierto un nuevo campo, denominado **ingeniería genética**, que implica la aplicación de la tecnología de DNA recombi-

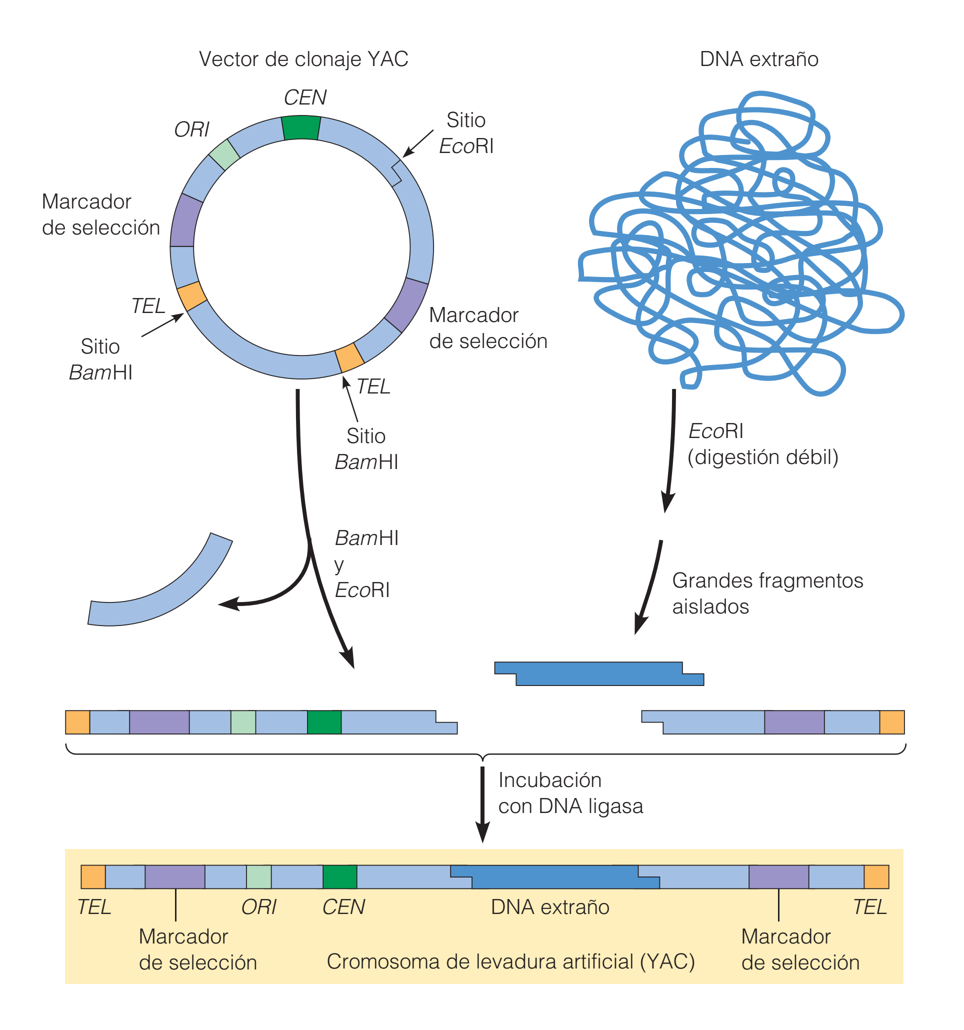


Figura 20.32 Construcción de un cromosoma artificial de levadura (YAC). El vector de clonaje YAC es una molécula de DNA circular con secuencias de nucleótido que especifican un origen de replicación de DNA (*ORI*), un centrómero (*CEN*), dos telómeros (*TEL*) y dos marcadores de selección. Tiene dos secuencias de reconocimiento para la enzima de restricción *Bam*HI y una para *Eco*RI. La digestión del vector YAC con ambas enzimas de restricción produce dos fragmentos de DNA lineal que juntos contienen todas las secuencias esenciales, así como el fragmento que conecta los sitios BamHI, que no tiene mayor utilidad. La mezcla de fragmentos se incuba con fragmentos procedentes de la digestión débil de un DNA extraño con *Eco*RI (la digestión débil genera grandes fragmentos puesto que no se cortan todos los sitios de restricción) y las hebras recombinantes resultantes se sellan con DNA ligasa. Entre los productos estarán los cromosomas artificiales de levadura —YACs— que portan el DNA extraño, como se muestra en la base de la figura. Una vez que las células de levadura se transforman con los productos del procedimiento, las colonias de células que han recibido YACs completos se pueden identificar por las propiedades que les confieren los dos marcadores de selección.

nante a problemas prácticos principalmente en medicina y agricultura. Para concluir el capítulo, examinaremos brevemente alguna de las áreas en las que empiezan a verse estos beneficios prácticos de la tecnología de DNA recombinante.

La ingeniería genética puede producir valiosas proteínas que de otro modo serían difíciles de obtener

Un beneficio práctico procedente de la tecnología del DNA recombinante es la capacidad para clonar genes que codifican proteínas útiles médicamente, difíciles de obtener por medios convencionales. Entre las primeras proteínas que se produjeron por ingeniería genética se encuentra la *insulina* humana, necesaria para que aproximadamente 2 millones de diabéticos, en los Estados Unidos, traten su enfermedad. Los suministros de insulina purificada a partir de sangre humana o de tejido pancreático son tremendamente escasos; así, durante muchos años, los pacientes diabéticos se trataban con insulina obtenida de cerdos o de ganado vacuno, que podían causar reacciones tóxicas. Ahora, hay varias maneras de producir insulina humana a partir de bacterias que por ingeniería genética contienen el gen de la insulina humana. El resultado es que, los diabéticos se pueden tratar con moléculas de insulina idénticas a la insulina producida por el páncreas humano.

Como la insulina, otras proteínas importantes, desde el punto de vista médico, que una vez fueron difíciles de obtener en cantidades adecuadas, ahora se producen usando la tecnología del DNA recombinante. Incluimos en esta categoría, los *factores de coagulación de la sangre* necesarios para el tratamiento de la hemofilia, la *hormona del crecimiento* utilizada para tratar el enanismo hipofisario, el *Activador del Plasminógeno Tisular (TPA)* utilizado para disolver los coágulos en los pacientes con ataques al corazón, la *eritropoyetina* empleada para estimular la producción de glóbulos rojos en pacientes con anemia, el *factor de necrosis tumoral*, el *interferón* y las *interleuquinas*, que se utilizan para tratar ciertos tipos de cáncer. Los métodos tradicionales para aislar y purificar tales proteínas a partir de sus fuentes naturales son bastante engorrosos y tienden a producir pequeñas cantidades de proteína. Por tanto, antes del advenimiento de la tecnología del DNA recombinante, el abastecimiento de tales sustancias era inadecuado y su coste era extremadamente alto. Pero ahora que los genes de esas proteínas se han clonado en bacterias y levaduras y se pueden producir en el laboratorio grandes cantidades de proteína a un coste razonable.

El plásmido Ti es un vector útil para introducir genes extraños en plantas

La tecnología del DNA recombinante se está utilizando también para modificar plantas importantes para la agricultura insertando genes diseñados para introducir caracteres como la resistencia a insectos, herbicidas o enfermedades virales, o para mejorar la capacidad de una planta para fijar nitrógeno, la eficiencia fotosintética, el valor nutricional o la capacidad para crecer en condiciones adversas. Los genes clonados se transfieren a las plantas insertándolos primero en el **plásmido Ti**, una molécula de DNA que se produce de manera natural y que la porta la bacteria *Agrobacterium tumefaciens.*

En la naturaleza, la infección de células de plantas por esta bacteria conduce a la inserción de una pequeña parte del DNA del plásmido, denominada *región T del DNA*, en el DNA cromosómico de la célula de la planta; la expresión del inserto de DNA dispara la formación de un crecimiento de tejido descontrolado denominado *tumor de la agalla de la corona.* En el laboratorio, las secuencias de DNA que desencadenan la formación de tumores se pueden retirar del plásmido Ti sin detener la transferencia de DNA desde el plásmido hasta el cromosoma de la célula huésped. Insertar genes de interés en plásmidos así modificados produce vectores que pueden transferir genes extraños a células de plantas.

En la Figura 20.33, se resume la aproximación general utilizada para transferir genes a plantas mediante este tipo de plásmidos.

El gen deseado se inserta primero en la región T del DNA del plásmido aislado usando técnicas de DNA recombinante estándar, el plásmido se vuelve a poner en la bacteria *Agrobacterium*, y estas bacterias modificadas genéticamente se utilizan para infectar células de plantas que crecen en cultivo. Cuando el plásmido recombinante entra en la célula de la planta, su T DNA se integra de manera estable en el genoma de la planta y se transmite a las células hijas en cada división celular. Tales células se utilizarán con posterioridad para regenerar plantas que contienen el T DNA recombinante —y por tanto el gen extraño deseado— en todas sus células. El gen extraño ahora se heredará por la progenie de la planta igual que cualquier otro gen. De tales plantas se dice que son **transgénicas**, un término general que se refiere a cualquier tipo de organismo, planta o animal que porta uno o más genes de otro organismo en todas sus células, incluyendo sus células reproductoras. Por lo general a las plantas transgénicas también se las denomina plantas *GM* (*genéticamente modificadas*).

La modificación genética puede mejorar los caracteres de una cosecha de alimentos

La capacidad para insertar nuevos genes en plantas usando el plásmido Ti ha permitido a los científicos crear cosechas GM que muestran variedad de nuevos caracteres. Por ejemplo, al introducir un gen clonado a partir de las bacterias del suelo *Bacillus thuringiensis* (Bt), se obtienen plantas más resistentes a los daños causados por los insectos. Este gen Bt codifica una proteína que es tóxica para ciertos insectos —orugas y escarabajos— que causan daños en las cosechas porque mordisquean las hojas de las plantas. Poner el gen Bt en las plantas de algodón y de maíz ha permitido que los granjeros limiten el uso de pesticidas más peligrosos para controlar a los insectos, repercutiendo en la mejora de la producción de las cosechas y en un retorno significativo de

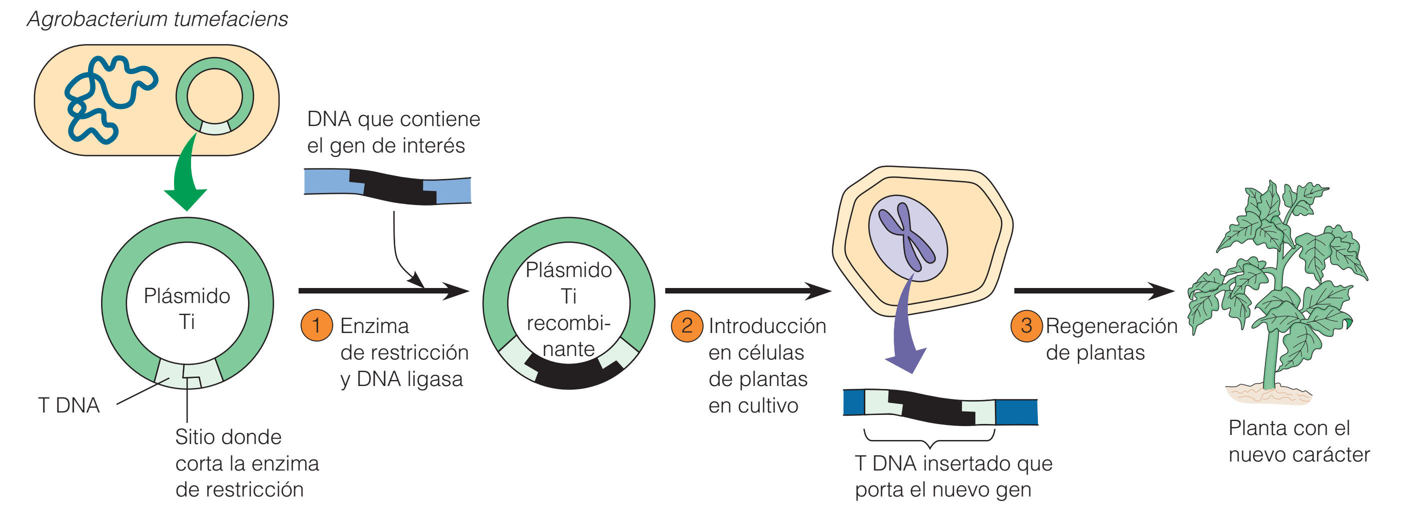


Figura 20.33 Utilización del plásmido Ti para transferir genes a plantas. La mayoría de los ingenieros genéticos de plantas utilizan el plásmido Ti como vector. ① El plásmido Ti se aísla de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, y un fragmento de DNA que contiene el gen de interés se inserta en un sitio de restricción localizado en la región T DNA del plásmido. ② Cuando el plásmido recombinante se introduce en las células vegetales, la región T DNA se integra en el DNA cromosómico de la célula de la planta. ③ Posteriormente, la célula se divide y regenera una nueva planta que contiene el T DNA recombinante incorporado de forma estable en el genoma de cada célula.

las especies silvestres a los campos de cultivo. Cuando en China varios millones de granjeros cambiaron el cultivo de sus cepas de algodón por otra GM resistente a los insectos, obtuvieron un 20% de incremento en la producción de algodón utilizando 78.000 toneladas menos de pesticidas, y presentaron una disminución significativa en la mortandad de los trabajadores de la granja por envenenamiento con pesticidas. Un razonamiento similar condujo a la introducción de genes que permiten a las cosechas resistir a los herbicidas que matan las malas hierbas, permitiendo de esta forma que los granjeros alcancen mayores producciones en los cultivos utilizando menor cantidad de químicos tóxicos.

La modificación genética también se puede utilizar para mejorar el valor nutricional de la comida. Considere el arroz, por ejemplo, que es la fuente de alimentación más común en el mundo. Actualmente se consume a diario por más de 3.000 millones de personas, y se espera que para el año 2020, por lo menos la mitad de la población del mundo dependa del arroz para alimentarse, sobre todo en los países pobres, en desarrollo. Muchas de estas mismas personas sufren deficiencias en nutrientes esenciales y vitaminas. Para ilustrar cómo la ingeniería genética se podría utilizar para mejorar la situación, en 2001 se introdujeron en el arroz, por ingeniería genética, los genes necesarios para la síntesis del β-caroteno, un precursor de la vitamina A. Se ha propuesto que el producto resultante denominado «arroz de oro» debido al color que proporciona el β-caroteno, podría ayudar a aliviar la deficiencia global de vitamina A que actualmente causa ceguera y enfermedades en millones de niños. Actualmente, el arroz de oro está sufriendo pruebas y evaluaciones para determinar si se alcanzan tales beneficios. Por supuesto, añadir una sola vitamina a una única cosecha no es suficiente para prevenir la malnutrición. Pero si resulta que tales técnicas se pueden utilizar con seguridad para mejorar el contenido de vitaminas y nutrientes de las cosechas de alimentos tales como arroz, trigo y maíz, quedaría un largo camino hacia la mejora del estatus nutricional global de la población mundial.

El deterioro de los alimentos es otra área abordada por la ingeniería genética. Un ejemplo interesante implica a los problemas asociados con el almacenamiento y transporte de tomates. Para hacerlos menos susceptibles a los daños y proporcionarles una vida más larga en los expositores, los tomates cultivados para el comercio se recogen antes de que estén completamente maduros. Pero esos tomates no tienen tan buen sabor como los que han madurado en la mata. Los científicos han intentado vencer este problema utilizando técnicas de ingeniería genética para crear los denominados tomates «Flavr Svr». Su estrategia es inhibir la producción de poligalacturonasa (PG), una enzima que cataliza la ruptura de la pared celular y que, por tanto, causa que el tomate se pudra. La PG se inhibió insertando una copia del gen de PG en las células orientado al contrario, provocando que las células afectadas produzcan un mRNA anormal complementario al mRNA producido por el gen de PG normal. El mRNA anormal denominado mRNA antisense, se une al mRNA normal por complementariedad de pares de bases e impide que éste funcione, conduciendo de esta forma a una disminución de la enzima PG. Puesto que producen menos enzima PG, los tomates Flavr Savr son menos susceptibles de pudrirse y por tanto, se les puede permitir madurar en la mata en vez de cogerlos verdes y duros. Aunque los tomates resultantes saben mejor y tienen una vida más larga en los expositores sin daños, no han tenido éxito debido a que los equipos convencionales de manejo de tomates tienden a dañar los tomates maduros y blandos.

Aumenta la preocupación por la seguridad y riesgos medioambientales de los cultivos GM

Como la prevalencia de los cultivos GM ha empezado a aumentar, algunas personas han mostrado preocupación acerca de los posibles riesgos asociados a esta tecnología, especialmente porque permite que los genes crucen las barreras de especie, que no se pueden cruzar por las técnicas de cultivo tradicionales. Para los consumidores, el principal foco de preocupación ha sido la seguridad, ya que se sabe que las reacciones tóxicas y alérgicas hacia las cosas que comemos pueden ser serias e incluso entrañan riesgo vital. Hasta ahora, parece claro que los alimentos convencionales ya en el mercado, tales como los cacahuetes y las nueces de Brasil representan un riesgo de alergia mayor de lo que se ha demostrado para cualquier alimento GM. Aunque ciertamente es posible que las nuevas alergias y reacciones tóxicas se pudieran haber disparado por los genes insertados en los cultivos GM, el mismo problema surge también cuando se produce una nueva cepa mediante las técnicas de cultivo tradicionales. De hecho, los alimentos convencionales ya han sufrido cambios masivos en su estructura genética mediante los métodos de cultivo de plantas tradicionales, y se puede discutir si es más seguro insertar genes seleccionados cuidadosamente en las plantas, uno cada vez, como se hace en la ingeniería genética, que alterar miles de genes al mismo tiempo, como se hace con el cruce de cultivos de plantas tradicional. Cuando un único gen se inserta en un cultivo, los efectos de un solo gen y los productos de su proteína se evalúan con más facilidad con respecto a los riesgos de seguridad.

Aumenta también la preocupación ante la posibilidad de que los cultivos GM supongan riesgos medioambientales. En 1999, en un experimento de laboratorio, los científicos informaron de que las larvas de la mariposa monarca murieron después de ser alimentadas con hojas espolvoreadas con polen de maíz GM que contenían el gen Bt. Estas observaciones hicieron temer que la toxina Bt producida por plantas GM pudiera afectar a insectos no dañinos. Sin embargo, la poyata del laboratorio no es como el campo de una granja, y los estudios iniciales se realizaron bajo condiciones de laboratorio artificiales en las que las larvas de mari-

posas consumieron dosis mucho más elevadas de la toxina Bt de lo que habrían consumido en el mundo real. Los datos posteriores recogidos en las granjas que tenían cultivos GM sugirieron que la cantidad de polen de maíz Bt que se encontraron en las condiciones reales no supone un peligro significativo para las mariposas monarca.

A pesar de las preocupaciones legítimas con respecto a los peligros potenciales, la experiencia GM revela pocas evidencias de riesgos significativos tanto para la salud humana como para el medioambiente. Por el contrario, la introducción de ciertos cultivos GM ha estado asociado incluso a reducciones en el uso de pesticidas, sugiriendo la posibilidad de efectos positivos sobre el medioambiente. Por supuesto, ninguna nueva tecnología está exenta de riesgos, de manera que la seguridad y el impacto medioambiental de los cultivos GM tiene que ser evaluado continuamente. Al mismo tiempo, es importante darse cuenta de que los cultivos GM podrían ser una excelente contribución a la lucha contra el hambre y las enfermedades en los países en desarrollo, ayudando a asegurar que el mundo será capaz de alimentar a los 2.000 millones de personas adicionales que se espera habiten la tierra en el próximo cuarto de siglo.

Se están desarrollando terapias génicas para el tratamiento de enfermedades humanas

Los humanos sufren muchas enfermedades de las que se piensa que se curarían transplantando copias de genes normales, funcionales, en personas que poseen genes defectuosos que causan enfermedades. Una de las primeras demostraciones con éxito de la viabilidad del transplante de genes, fue presentada por Richard Palmiter, quien transfirió el gen para la hormona de crecimiento en un óvulo de ratón, creando así un ratón transgénico que porta un gen de otro organismo en sus células (Anexo 20A). El éxito de este experimento plantea la cuestión de si las técnicas de transplante de genes podrían ser aplicadas al problema de la reparación de genes defectuosos en humanos. Candidatos obvios para semejante aproximación, denominada *terapia génica*, incluyen enfermedades genéticas transmisibles como la fibrosis quística, hemofilia, hipercolesterolemia, enfermedades de la hemoglobina, distrofia muscular, enfermedades de almacenamiento de los lisosomas, y una enfermedad inmune denominada *inmunodeficiencia severa combinada* (*SCID*, del inglés *Severe Combined Immuno-Deficiency*).

La primera persona a la que se trató utilizando terapia génica fue a una niña de 4 años con un tipo de SCID causada por un defecto en el gen que codifica a la *adenosina deaminasa* (*ADA*). La pérdida de la actividad ADA conduce a una incapacidad de producir un número suficiente de células inmunes denominadas *linfocitos T*. Como resultado, la niña sufrió infecciones frecuentes que potencialmente amenazaban su vida. En 1990, sufrió una serie de tratamientos en los que una copia normal del gen de ADA clonado se insertó en un virus, el virus se utilizó para infectar los linfocitos T obtenidos a partir de sangre de la niña, y los linfocitos se reinyectaron en su flujo sanguíneo. El resultado fue una mejora significativa de su función inmune, aunque el efecto disminuyó a lo largo del tiempo y el tratamiento no parecía ayudar demasiado a los pacientes con SCID.

En estos años que han pasado desde que se realizaron estos estudios pioneros, se han realizado progresos considerables para desarrollar mejores técnicas de transferencia de genes clonados a células blanco y conseguir que los genes funcionen apropiadamente. Finalmente, en el año 2000, científicos franceses presentaron lo que parecía ser un tratamiento con éxito para niños con SCID (en este caso una forma especialmente severa de SCID causada por un defecto del gen del receptor más que por un defecto en el gen de ADA). Utilizando un virus que era más eficiente en transferir genes clonados e ideando mejores condiciones en el cultivo de las células durante el proceso de transferencia génica, estos científicos fueron capaces de devolver los niveles normales de función inmune a los niños a los que trataron. De hecho, el resultado fue tan dramático que por primera vez, los niños tratados fueron capaces de abandonar la «burbuja» protectora de aislamiento que habían estado utilizando en el hospital para protegerse de las infecciones.

Fue por tanto una gran decepción el que dos de los diez niños tratados en el estudio inicial desarrollaran leucemia pocos años después. El examen de sus células leucémicas reveló que el virus usado para transportar el gen corrector se había insertado asimismo junto a un gen normal, que cuando se expresa anormalmente, puede producir cáncer. (En el Capítulo 24 describiremos exactamente cómo tal suceso, llamado *mutagénesis por inserción* puede iniciar el desarrollo del cáncer.) Este resultado fue un contratiempo inesperado ya que el virus no poseía ningún gen ni ninguna otra característica que permitiera a los científicos predecir su riesgo de cáncer. No debemos, por supuesto, perder de vista el hecho de que estos estudios también proporcionaron uno de los primeros signos esperanzadores de que la terapia génica puede curar una enfermedad genética con riesgo vital. Sin embargo, los riesgos de cáncer asociados deben comprenderse mejor antes de que sean posibles más progresos.

Una táctica para abordar el problema de riesgo de cáncer es cambiar el tipo de virus usado para transportar los genes al interior de las células diana. Los estudios SCID emplean *retrovirus* (página 712), que se insertan aleatoriamente dentro del DNA cromosómico y poseen secuencias que activan en el huésped genes adyacentes inadvertidamente. Otro tipo de virus que se investiga, como vehículo para terapia génica, se llama *virus adeno-asociado (AAV)*, éste es menos susceptible de insertarse en el DNA cromosómico y menos susceptible de activar genes del huésped inadvertidamente cuando se inserta. Se han obtenido algunos

Superratón: un primer triunfo transgénico

Un fragmento de DNA que contiene el gen de la hormona de crecimiento de rata se microinyectó en el pronúcleo de óvulos de ratón fertilizados. De los 21 ratones que se desarrollaron de esos óvulos, siete portaron el gen y seis de éstos crecieron significativamente más que sus hermanos de camada (Palmiter y cols., 1982, página 611).

Con estas palabras un grupo de investigadores liderado por Richard Palmiter y Ralph Brinster informaron sobre cómo se puede introducir un carácter genético experimentalmente en ratones, sin pasar por el procedimiento tradicional de cría —es decir, reproducción sexual seguida de la selección de los caracteres deseados—. Los investigadores inyectaron los genes de la hormona de crecimiento de rata en los óvulos fertilizados de ratones, y a partir de uno de estos óvulos desarrollaron un «superratón» que pesaba casi el doble que sus compañeros de camada (Figura 20A.1). El logro se publicó como un avance significativo puesto que hacía viable la aplicación de la ingeniería genética en los animales, con todas sus consecuencias científicas y prácticas.

Lo que Palmiter, Brinster y sus colegas hicieron al crear el superratón es una historia intrigante que empieza con el aislamiento del gen de la hormona de crecimiento (GH) de una biblioteca de DNA de rata, utilizando técnicas similares a las descritas en este capítulo. El gen de GH clonado del que se había eliminado la región reguladora se había unido a la porción reguladora de un gen de ratón, el gen que codifica para la *metalo tioneina (MT)*. La MT es una pequeña proteína que se une a metales, que normalmente está presente en la mayoría de tejidos murinos y que parece que está implicada en regular el nivel de zinc en el animal. La ventaja de fusionar el gen de MT al gen de GH era que la expresión del gen de MT podía ser inducido (encendido) de forma específica por zinc.

Para hacer copias múltiples del gen híbrido MT–GH, éste se clonó en *E. coli* usando como vector de clonaje un plásmido. Después de aislar el DNA del plásmido recombinante de las bacterias, la región MT-GH se escindió digiriendo el DNA con dos enzimas de restricción, cada una de las cuales cortaba en un sitio de restricción localizado en un extremo del fragmento de DNA deseado. Se microinyectaron unas 600 copias del fragmento de DNA escindido, en un volumen de aproximadamente 2 picolitros (¡0, 000002 μL!) en óvulos de ratón fertilizados. El DNA se inyectó en los pronúcleos masculinos, el núcleo del espermatozoide haploide que todavía no se ha fusionado con el núcleo haploide del óvulo. (La tasa de éxito para la integración y retención del gen MT-GH se vio que era superior cuando se utilizaba el pronúcleo masculino que cuando se inyectaba el DNA en el pronúcleo femenino o en el citoplasma.) De los 170 óvulos fertilizados que se inyectaron y se reimplantaron en el tracto reproductor de madres adoptivas, se desarrollaron 21 animales. Siete de ellos resultaron ser ratones transgénicos con genes MT-GH presentes en sus células. En un caso por lo menos, un ratón transgénico transmitió el gen MT-GH con éxito a la mitad de su descendencia, sugiriendo que el gen había sido integrado de manera estable en uno de sus cromosomas.

Puesto que el gen de GH se había ligado a la región reguladora del gen de MT, era previsible que el gen híbrido se activara dándole zinc al ratón en su agua de beber. Tres tipos de evidencias confirmaron que la exposición del ratón al zinc provocaba que se expresara el gen de GH. La primera es que cuando el tejido hepático del ratón se evaluó para detectar RNA mensajero de GH, los resultados indicaron la presencia de entre 800 y 3.000 moléculas de mRNA por célula hepática. Además, se encontraron niveles elevados de GH en sangre: cuatro de los ratones transgénicos tenían niveles de GH en sangre que eran ¡entre 100 y 800 veces más altos que los de sus compañeros de camada que no estaban modificados por ingeniería genética! Pero la evidencia más dramática de la expresión de los genes de GH de rata fue que los ratones transgénicos crecían más rápidamente y pesaban aproximadamente el doble que los ratones normales. Durante el periodo de máxima sensibilidad a la hormona de crecimiento (desde las 3 semanas a los 3 meses de vida), los animales transgénicos crecían de tres a cuatro veces más rápido que sus hermanos de camada normales.

Este experimento dramático probaba que es posible introducir genes clonados en las células de organismos superiores y que tales genes se pueden integrar de manera estable en el genoma, en donde se expresan y se transmiten a la descendencia. Como señalaban los autores cuando se publicó el artículo «este abordaje tiene implicaciones para el estudio de los efectos biológicos de la hormona de crecimiento, como una forma de acelerar el crecimiento de los animales, como un modelo de gigantismo (una anormalidad del crecimiento humano causado por la hormona de crecimiento), como un medio de corregir enfermedades genéticas y como método para revalorizar los productos de la agricultura». Queda por ver si todas estas posibilidades se convierten en realidades, y cuánto se tarda en ello. En estos años desde que se creó el superratón se han realizado rápidos progresos en la mayoría de estas áreas. Parece ser que el superratón, fue sólo el principio.



Figura 20A.1 Ingeniería genética en ratones. El «superratón» a la izquierda es significativamente más grande que su hermano de camada, puesto que ha sido tratado por ingeniería genética y expresa niveles elevados del gen de la hormona de crecimiento de rata.

resultados alentadores utilizando este virus en pacientes con *hemofilia*, una enfermedad hereditaria caracterizada por episodios hemorrágicos incontrolables con riesgo vital. La hemofilia está causada por defectos genéticos de proteínas denominadas *factores de coagulación sanguíneos* que participan en la formación de los coágulos sanguíneos. En los ensayos de terapia génica, varios pacientes hemofílicos fueron inyectados en la pierna con AAV que contenía un gen que codifica el factor de coagulación sanguíneo que necesitan. Pocos meses después, los músculos de la pierna producían el factor de coagulación sanguíneo en cantidades suficientes como para mejorar brevemente la enfermedad, aunque no para curarla. Éste fue un descubrimiento intrigante ya que a diferencia de los ensayos SCID en los que los genes se insertaron en células aisladas que habían sido extraídas del cuerpo, los estudios sobre la hemofilia usaron un virus transportador de genes que se les inyectó directamente a los pacientes. (Otro ejemplo de terapia génica que implica a células que aún residen dentro del cuerpo fue tratado en el Anexo 8B, que discute el posible tratamiento de la fibrosis quística con nebulizadores nasales que contienen el gen CFTR.)

En los años transcurridos desde que se hizo público por primera vez el enorme potencial de la terapia génica en los primeros años de la década de los 80, el área ha sido criticada por prometer demasiado y dar demasiado poco. Sin embargo, la mayoría de las nuevas tecnologías necesitan tiempo para perfeccionarse y se encuentran con decepciones en el camino, y la terapia génica no es una excepción. A pesar de los contratiempos parece probable que usar genes normales para tratar enfermedades genéticas es una meta alcanzable que algún día podría ser práctica común al menos para unas pocas enfermedades genéticas debidas a defectos en un solo gen. Por supuesto, la capacidad de alterar los genes de la gente, despierta importantes preocupaciones éticas, de seguridad y legales. La pregunta esencial sobre cómo la sociedad controlará nuestro creciente poder para cambiar el genoma humano es un tema que necesitará discutirse en profundidad no sólo por los científicos y médicos sino por la sociedad en conjunto.

Perspectiva

La reproducción asexual se basa en la mitosis y produce descendencia genéticamente idéntica (o casi) al único progenitor. La reproducción sexual, por otro lado, involucra a dos progenitores y produce una mezcla de caracteres parentales en la descendencia. La reproducción sexual permite que las poblaciones se adapten a los cambios ambientales, favorece el hecho de que mutaciones deseables se combinen en un único individuo, y promueve la flexibilidad genética para el mantenimiento de un genoma diploide.

El ciclo vital de todas las especies eucarióticas que se reproducen sexualmente incluye fases tanto haploides como diploides. Los gametos haploides se generan por meiosis y se fusionan en la fertilización para restablecer el número diploide de cromosomas. La meiosis consiste en dos divisiones celulares sucesivas sin que exista duplicación de cromosomas. Durante la primera división meiótica, se separan los cromosomas homólogos y se segregan en dos células hijas. Durante la segunda división meiótica, las cromátidas hermanas se separan y se producen cuatro células hijas haploides. Además de reducir el número de cromosomas de diploide a haploide, la meiosis se diferencia de la mitosis en que entre los cromosomas homólogos tiene lugar la sinapsis durante la profase de la primera división meiótica, permitiendo de ese modo, el sobrecruzamiento y la recombinación genética entre las cromátidas no hermanas.

Las leyes de la herencia de Mendel describen las consecuencias genéticas del comportamiento de los cromosomas durante la meiosis, incluso aunque los cromosomas todavía no se habían descubierto en el momento en que Mendel realizaba sus experimentos. De acuerdo con estas leyes, los alelos maternos y paternos se segregan en gametos diferentes durante la meiosis y los alelos de los genes localizados en cromosomas separados se distribuyen independientemente unos de otros. La enorme variabilidad genética entre los gametos de un organismo surge en parte de la segregación independiente de los cromosomas durante la anafase I y en parte de la recombinación que se produce durante la profase I. La frecuencia de recombinación entre genes localizados en el mismo cromosoma es una medida de la distancia entre los genes y puede ser utilizada, por tanto, para establecer un mapa de sus localizaciones cromosómicas. Además de lo que ocurre en la meiosis de los eucariotas, también se observa recombinación genética en virus (durante infección conjunta) y cuando se transfiere el DNA en las células procariotas por transformación, transducción o conjugación. El mecanismo de recombinación implica ruptura e intercambio entre moléculas de DNA que muestran una gran homología en sus secuencias. La recombinación a veces va acompañada por la conversión de genes o por la formación de moléculas de DNA cuyas dos hebras no son completamente complementarias la una con respecto a la otra. Estos fenómenos se pueden explicar mediante modelos de recombinación que implican la formación de uniones de Holliday, que son regiones de intercambio de cadenas sencillas entre moléculas de DNA de doble cadena.

El desarrollo de la tecnología de DNA recombinante ha hecho posible combinar DNA de dos (o más) fuentes en una única molécula de DNA recombinante. Combinando el gen de interés con un plásmido o un fago que actúan como vectores de clonaje, permite clonar (amplificar) el gen en las células bacterianas. De esta forma, se pueden preparar grandes cantidades de genes específicos o de sus productos proteicos para investigación o para propósitos prácticos. La tecnología del DNA recombinante ha hecho posible el análisis detallado y la manipulación de genomas eucarióticos, incluyendo el genoma humano. Al mismo tiempo, las aplicaciones prácticas de esta tecnología tienen el potencial de revolucionar la medicina moderna y la agricultura.

Problemas

Los problemas de mayor dificultad están marcados con un •.

20.1 La verdad sobre el sexo. Para cada una de las siguientes aseveraciones, indique con una S si es verdadero para la reproducción sexual, con una A si es verdadero para la reproducción asexual, con una B si es verdadero para ambas y con una N si no es verdadero para ninguna de ellas.

(a) Los caracteres de dos parentales diferentes se pueden combinar en un único descendiente.

(b) Cada generación de descendientes es prácticamente idéntica a la generación precedente.

(c) Las mutaciones se propagan a la generación posterior.

(d) En cada generación algunos descendientes pueden estar menos preparados para la supervivencia que los parentales, pero otros pueden estar mejor preparados.

(e) La mitosis está implicada en el ciclo celular.

20.2 Ordenando las fases de la meiosis. En la Figura 20.34 se muestran dibujos de varias fases de la meiosis de un organismo, marcados desde la letra A hasta la letra F.

(a) ¿Cuál es el número diploide de cromosomas en estas especies?

(b) Coloque estas seis fases en orden cronológico, y nombre cada una de ellas.

(c) ¿Entre cuál de estas dos fases se separan los centrómeros homólogos?

(d) ¿Entre qué dos fases sucede la recombinación?

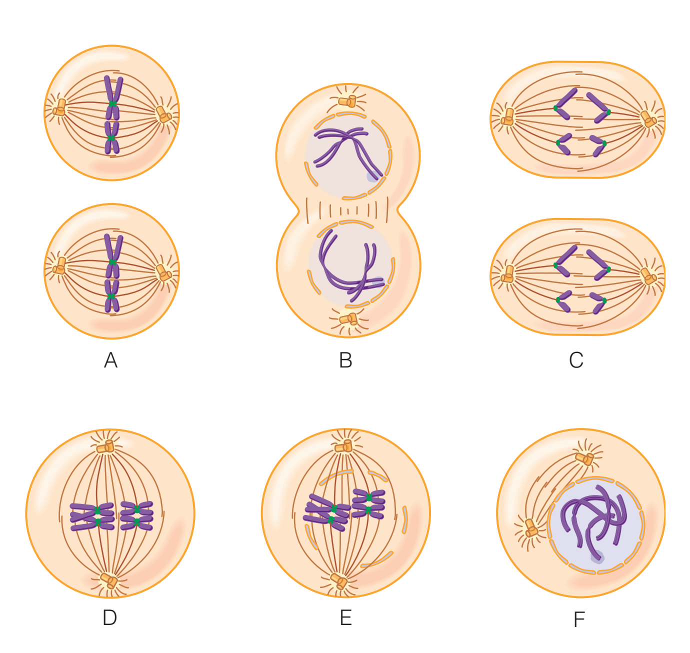


Figura 20.34 Seis fases de la meiosis para ordenar e identificar. *Véase* Problema 20.2.

20.3 Hablando de ellas por separado. Describa brevemente cómo se podrían distinguir cada uno de los siguientes pares de fases en el mismo organismo:

(a) Metafase de la mitosis y metafase I de la meiosis.

(b) Metafase de la mitosis y metafase II de la meiosis.

(c) Metafase I y metafase II de la meiosis.

(d) Telofase de la mitosis y telofase II de la meiosis.

(e) Las etapas de Paquitene y Diplotene de la Profase I meiótica.

20.4 Marcaje de centrómeros. Suponga que tiene un organismo diploide en el que los cromosomas aportados por el espermatozoide tienen marcadores citológicos en los centrómeros que le permiten distinguirlos visualmente con respecto a los cromosomas aportados por el óvulo.

(a) ¿Se podría esperar que todas las células somáticas (las células que no son gametos) de este organismo, tuvieran el mismo número de centrómeros maternos que paternos? Explíquelo.

(b) ¿Se podría esperar el mismo número de centrómeros maternos que paternos en cada gameto producido por ese individuo? Explíquelo.

20.5 ¿Cuánto DNA? Sea X la cantidad de DNA presente en el gameto de un organismo que tiene un número de cromosomas diploide igual a 4. Asumiendo que todos los cromosomas son más o menos del mismo tamaño, cuánto DNA (X, $2X$, $^1/_2X$ y así sucesivamente) esperaría en cada una de las siguientes opciones?

(a) Un zigoto inmediatamente después de la fertilización.

(b) Una única cromátida hermana.

(c) Una célula hija después de la mitosis.

(d) Un único cromosoma después de la mitosis.

(e) Un núcleo en profase mitótica.

(f) La célula durante metafase II de la meiosis.

(g) Un bivalente.

20.6 Errores meióticos. Los niños nacidos con el síndrome de Patau tienen una copia extra del cromosoma 13, que conduce a desarrollar anormalidades con el labio leporino y paladar hendido, ojos pequeños y dedos de las manos y de los pies extra. Otro tipo de enfermedad genética denominada síndrome de Turner, se produce por la presencia de un único cromosoma sexual —un cromosoma X—. Los individuos nacidos con un único cromosoma X son mujeres que muestran pocos defectos aparentes hasta la pubertad, que es cuando no desarrollan senos normales ni órganos sexuales internos. Describa los acontecimientos meióticos que conducirían al nacimiento de un individuo bien con el síndrome de Patau o bien con el síndrome de Turner.

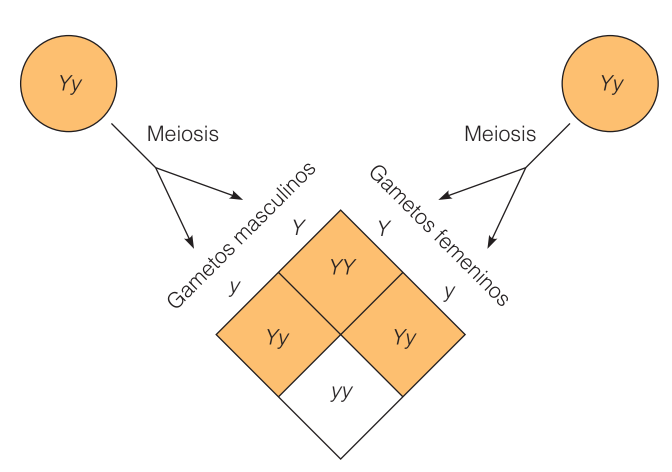
20.7 Los cuadros de Punnet como herramientas genéticas. Un *cuadro de Punnett* es un diagrama que representa todos los resultados posibles de un cruzamiento genético. Los genotipos de todos los gametos posibles del parental masculino y femenino se colocan a los lados adyacentes de un cuadrado, entonces cada recuadro de la matriz se utiliza para representar el genotipo resultante de la unión de los dos gametos de las cabeceras de las dos hileras que se cruzan en la intersección. Por la ley de la segregación independiente, todas las posibles combinaciones son igualmente probables, de manera que la

frecuencia de un genotipo dado en los recuadros representa la frecuencia de ese genotipo en la progenie del cruzamiento genético representado por el cuadro de Punnett.

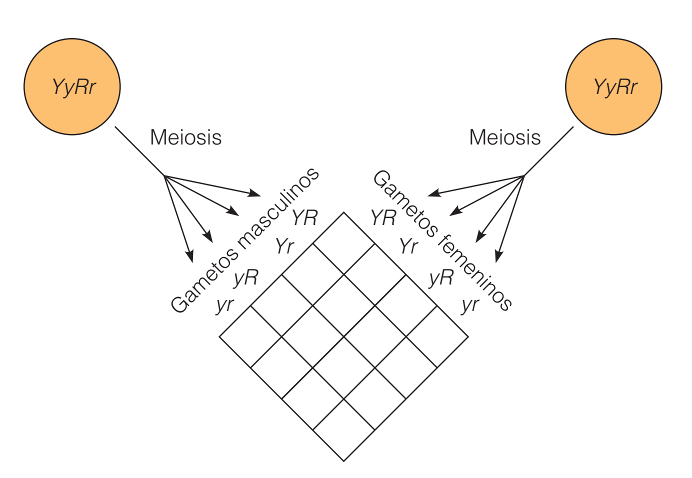
La Figura 20.35 muestra los cuadros de Punnett para dos cruzamientos de plantas de guisantes. Los caracteres genéticos implicados son el color de la semilla (donde *Y* es el alelo para las semillas amarillas e *y* para las semillas verdes) y la forma de la semilla (donde *R* es el alelo para la semilla redonda y *r* para las semillas rugosas). El cuadro de Punnett de la Figura 20.35a representa un cruzamiento de un único factor entre las plantas parentales siendo ambas heterocigotos para el color de la semilla (*Yy* x *Yy*). El cuadro de Punnett de la Figura 20.35b es un cruzamiento de dos factores entre plantas heterocigotas tanto para el color de la semilla (*Yy*) como para la forma de la semilla (*Rr*).

(a) Usando el cuadro de Punnett de la Figura 20.35a, explique las proporciones fenotípicas que Mendel observó en la descendencia de un cruzamiento de este tipo.

(b) Explique por qué el cuadro de Punnett de la Figura 20.35b es una matriz 4 × 4 con 16 genotipos. ¿Cuál es en general la relación matemática entre el número de pares alélicos heterocigóticos que se están considerando y el número de las diferentes clases de gametos?



(a) Cruzamiento de un factor



(b) Cruzamiento de dos factores

Figura 20.35 Cuadros de Punnett. *Véase* Problema 20.7.

(c) ¿Cómo refleja el cuadro de Punnett de la Figura 20.35b, la ley de la segregación independiente de Mendel?

(d) Complete el cuadro de Punnett de la Figura 20.35b escribiendo cada uno de los posibles genotipos de la progenie. ¿Cuántos genotipos diferentes se encontrarán en la progenie? ¿En qué proporciones?

(e) En el caso de la Figura 20.35b, ¿cuántos genotipos diferentes se encontrarán en la progenie? ¿En qué proporciones?

•20.8 Mapeo genético. La siguiente tabla proporciona datos relativos a la frecuencia con la que cuatro genes (*w*, *x*, *y* y *z*) localizados en el mismo cromosoma se recombinan.

Genes	Frecuencia de recombinación
w y *x*	25%
w e *y*	29%
w y *z*	17%
x e *y*	50%
x y *z*	9%
y y *z*	44%

(a) Construya un mapa genético indicando el orden en el que se encuentran estos cuatro genes y el número de unidades de mapa que separan estos genes entre sí.

(b) Al construir este mapa, usted puede haberse dado cuenta de que las distancias del mapa no son exactamente aditivas. ¿Puede proporcionarnos una explicación para esta aparente discrepancia?

•20.9 Recombinación homóloga. Las células bacterianas utilizan por lo menos tres vías para realizar la recombinación genética. Las tres vías requieren la proteína RecA, pero en cada caso, un grupo de etapas diferentes precede a la acción de RecA para catalizar la invasión de la hebra. Una de estas tres vías utiliza un complejo enzimático denominado RecBCD, que se une al corte de la doble hélice del DNA y muestra tanto actividad helicasa como actividad nucleasa de cadena sencilla.

(a) Describa brevemente un modelo que muestre cómo el complejo enzimático RecBCD podría disponer el escenario para la recombinación genética.

(b) Cuando las células bacterianas se infectan conjuntamente con dos cepas diferentes del bacteriófago λ, los genes situados cerca de ciertas regiones del DNA del fago, denominados *sitios CHI*, se recombinan con frecuencias mucho mayores que otros genes. Sin embargo, en bacterias mutantes a las que les falta la proteína RecBCD, los genes localizados en los sitios CHI no se recombinan mucho más frecuentemente que otros genes. ¿Cómo modificaría usted su modelo para que se adapte a esta información adicional?

•20.10 Tecnología de DNA recombinante. Un investigador quiere estudiar una proteína importante implicada en la gametogénesis humana. Puesto que esta proteína es muy difícil de preparar en cantidades suficientes a partir de células humanas, decide clonar este gen de manera que, si todo va bien, pueda usar las bacterias para fabricar grandes lotes de la proteína. La secuencia de aminoácidos de la única cadena polipeptídica de la proteína ya ha sido establecida. Explique brevemente cómo podría clonar el gen deseado.

Bibliografía recomendada

Las referencias con importancia histórica están marcadas con •.

Meiosis

de Lange, T. Ending up with the right partner. *Nature* 392 (1998): 753.

Haber, J. E. Meiosis: Searching for a partner. *Science* 279 (1998): 823.

John, B. *Meiosis*. New York: Cambridge University Press, 1990.

Kitajima, T. S., S. A. Kawashima y Y.Watanabe. The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature* 427 (2004): 510.

Page, S. L. y R. S. Hawley. Chromosome choreography: The meiotic ballet. *Science* 301 (2003): 785.

Petronczki, M., M. F. Slomos y K. Nasmyth. Un ménage à quatre: The molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 112 (2003): 423.

Experimentos de Mendel

Fincham, J. R. S. Mendel-now down to the molecular level (News and Views). *Nature* 343 (1990): 208.

•Mendel, G., H. de Vries, C. Correns y E. Tschermak. The birth of genetics. *Genetics* 35 (1950, Suppl.): 1. (Original papers in English translation.)

•Sturtevant, A. H. *A History of Genetics*. New York: Harper & Row, 1965.

Mecanismo de recombinación

Clark, A. J. *recA* mutants of *E. coli* K12: A personal turning point. *BioEssays* 18 (1996): 767.

Heyer,W.-D., K. T. Ehmsen y J. A. Solinger. Holliday junctions in the eukaryotic nucleus: resolution in sight? *Trends Biochem. Sci.* 28 (2003): 548.

Leach, D. *Genetic Recombination*. Cambridge, MA: Blackwell Science, 1996.

Lilley, D. M. J. y M. F.White. The junction-resolving enzymes. *Nature Reviews Molecular Cell Biol.* 2 (2001): 433.

Stahl, F. Meiotic recombination in yeast: Coronation of the doublestrand-break repair model. *Cell* 87 (1996): 965.

Sung, P. *et al.* Rad51 recombinase and recombination mediators. *J. Biol. Chem.* 278 (2003): 42729.

Tecnología de DNA recombinante e ingeniería genética

Brown, K., K. Hopkin y S. Nemecek. Genetically modified foods: Are they safe? *Sci. Amer.* 284 (April 2001): 51.

Cavazanna-Calvo, M., A. Thrasher y F.Mavilio. The future of gene therapy. *Nature* 427 (2004): 779.

•Chilton, M. D. A vector for introducing new genes into plants. *Sci. Amer.* 248 (junio de 1983): 50.

Friedman, T. Overcoming the obstacles to gene therapy. *Sci. Amer.* 276 (junio de 1997): 96.

Glick, B. R. y J. J. Pasternak.*Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*, 3d ed. Herndon,VA: ASM Press, 2003.

Kay, M. A., *et al.* Evidence for gene transfer and expression of factor IX in hemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nature Genetics* 24 (2000): 257.

Kay, M. A. y H. Nakai. Looking into the safety of AAV vectors. *Nature* 424 (2003): 251.

Kmiec, E. B. Gene therapy. *American Scientist* 87 (1999): 240.

Kohn, D. B., M. Sadelain y J. C. Glorioso. Occurrence of leukemia following gene therapy of X-linked SCID. *Nature Reviews Cancer* 3 (2003): 477.

•Palmiter, R. D., *et al.* Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300 (1982): 611.

Qaim, M. y D. Zilberman. Yield effects of genetically modified crops in developing countries. *Science* 299 (2003): 900.



21

Expresión génica: I. El código genético y la transcripción

Hasta ahora, hemos descrito al DNA como el material genético de las células y los organismos. Conocemos ya su estructura, química y replicación así como la forma en que se empaqueta en los cromosomas y cómo se reparte entre dos células hermanas durante las divisiones meiótica y mitótica. Estamos ahora preparados para explorar cómo se expresa el DNA, es decir, cómo se usa la información codificada que contiene para sintetizar RNA y proteínas. La exposición de este tema tan importante se divide en tres capítulos. Este capítulo se refiere a la naturaleza del código genético y la forma en que la información contenida en el DNA guía la síntesis de las moléculas de RNA en el proceso que denominamos *transcripción.* El Capítulo 22 describirá cómo se usan las moléculas de RNA para dirigir la síntesis de proteínas específicas, en el proceso denominado *traducción.* Por último, el Capítulo 23 se ocupa de los distintos mecanismos usados por las células para controlar la transcripción y traducción que constituyen la *regulación* de la expresión génica. Para contextualizar estos conceptos, empezaremos por una visión general de los papeles que desempeñan el DNA, el RNA y las proteínas en la expresión génica.

El flujo direccional de la información genética

Como mencionamos al principio de esta unidad, el flujo de información genética en las células tiene lugar generalmente desde el DNA al RNA y a las proteínas (*véase* Figura 18.1). El DNA (más concretamente, un segmento de una hebra de DNA) sirve primero como molde para la síntesis de una molécula de RNA, que en la mayoría de los casos dirige después la síntesis de una proteína concreta. (En algunos casos, el RNA es el producto final de la expresión génica y funciona como tal en la célula.) El principio del flujo direccional de información del DNA al RNA y proteína se conoce como *dogma central de la biología molecular*, un término ideado por Francis Crick poco después de que el modelo de la doble hélice de DNA se propusiera por primera vez. Este principio se resume de la siguiente manera:

Replicación del DNA ↻ DNA —transcripción→ RNA —traducción→ proteína

Así, el flujo de información genética implica la replicación del DNA, la transcripción de la información contenida en el DNA en forma de RNA y la traducción de esta información del RNA a la proteína. El término transcripción se utiliza para referirse a la síntesis de RNA usando el DNA como molde para resaltar que esta fase de la expresión génica es sólo una transferencia de información de un ácido nucleico a otro, de manera que el «lenguaje» básico sigue siendo el mismo. Por el contrario, la síntesis de proteínas se denomina **traducción** porque implica un cambio de lenguaje, de una secuencia de nucleótidos de una molécula de RNA a una secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica.

El RNA que se traduce a proteína se denomina **RNA mensajero (mRNA)** porque lleva el mensaje genético desde

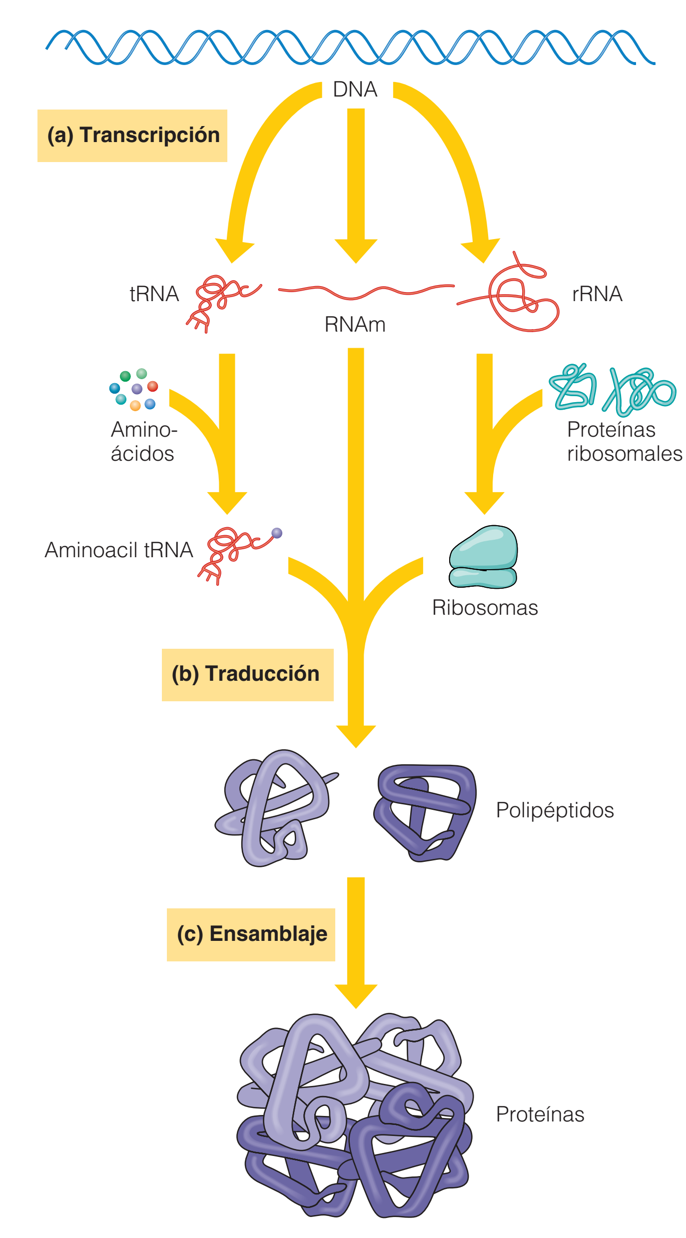


Figura 21.1 Los RNAs como intermediarios del flujo de información genética. Los tres tipos principales de RNA-tRNA, mRNA y rRNA-son (**a**) sintetizados mediante la transcripción de las secuencias adecuadas del DNA (genes) y (**b**) están implicados en el proceso posterior de traducción (síntesis de polipéptidos). El RNA de transferencia lleva los aminoácidos adecuados al mRNA y al ribosoma. Una molécula de tRNA que lleva un aminoácido se denomina aminoacil tRNA. Los polipéptidos se pliegan después y (**c**) se ensamblan dando lugar a proteínas funcionales. Los polipéptidos que se muestran aquí son concretamente cadenas de globina de la proteína hemoglobina. Para simplificar, esta figura omite muchos detalles que se describirán en este capítulo y en el siguiente.

el DNA a los ribosomas, donde tiene lugar realmente la síntesis de proteínas. Además del mRNA, hay otros dos tipos de RNA implicados en la síntesis de proteínas: las moléculas de **RNA ribosómico (rRNA)**, que forman parte del ribosoma, y las moléculas de **RNA de transferencia (tRNA),** que transcriben la secuencia base codificada en el RNA mensajero y llevan el aminoácido adecuado al ribosoma. Fíjese en que el RNA ribosómico y el de transferencia no codifican proteínas en sí mismos; así, los genes que codifican estos dos tipos de RNA son ejemplos de genes cuyos productos finales son moléculas de RNA en lugar de proteínas. En la Figura 21.1 se representa el papel de los tres principales tipos de RNA en el flujo global de información del DNA a las proteínas.

Durante los años transcurridos desde el establecimiento del dogma central de Crick, éste se ha redefinido de varias formas. Por ejemplo, se ha encontrado que muchos virus con genomas de RNA sintetizan moléculas de RNA utilizando RNA como molde. Otros virus de RNA, como el VIH, llevan a cabo un proceso de *transcripción inversa*, donde el RNA viral se usa como molde para la síntesis de DNA —un flujo de información genética «a la inversa»—. (El Anexo 21A aporta más información sobre estos virus y el papel de la transcripción inversa en el reordenamiento de secuencias de DNA). A pesar de estas variaciones sobre el modelo original, el principio de que la información fluye desde el DNA al RNA y a las proteínas, sigue siendo la regla general por la que se dirige la expresión génica en todas las células.

El código genético

La esencia de la expresión de los genes se encuentra en la relación entre la secuencia de bases de los nucleótidos de las moléculas de DNA y el orden lineal de aminoácidos en las moléculas de proteína. Esta relación está basada en un conjunto de reglas conocidas como **código genético**. La interpretación de este código, que nos dice cómo el DNA puede codificar proteínas, es uno de los hitos de la biología del siglo XX.

Durante el flujo de información del DNA al RNA y a las proteínas es fácil imaginar cómo es posible que la información que reside en la secuencia de bases del DNA pueda pasar al mRNA a través del mecanismo de complementariedad. ¿Cómo pasa, sin embargo, el mensaje el mRNA a las proteínas? Para los no iniciados, el mensaje mostrado en la Figura 21.2a es sólo una serie de nucleótidos en una molécula de mRNA, sin un significado obvio. Pero, teniendo acceso al código genético (Figura 21.2b; *véase también* Figura 21.8), cualquiera puede convertir la secuencia de bases de purina y pirimidina del mRNA en una cadena de aminoácidos, y el mensaje se hace reconocible como un polipéptido (Figura 21.2c). Así, una secuencia de bases nucleotídicas puede contener la información para guiar la síntesis proteica pero debe ser traducido en una secuencia de aminoácidos para tener sentido para la célula.

Lo que se necesita es, por supuesto, conocer el código apropiado —el conjunto de reglas que determinan qué nucleótidos del mRNA corresponden a cada aminoácido—. El mensaje codificado puede ser entonces traducido a las

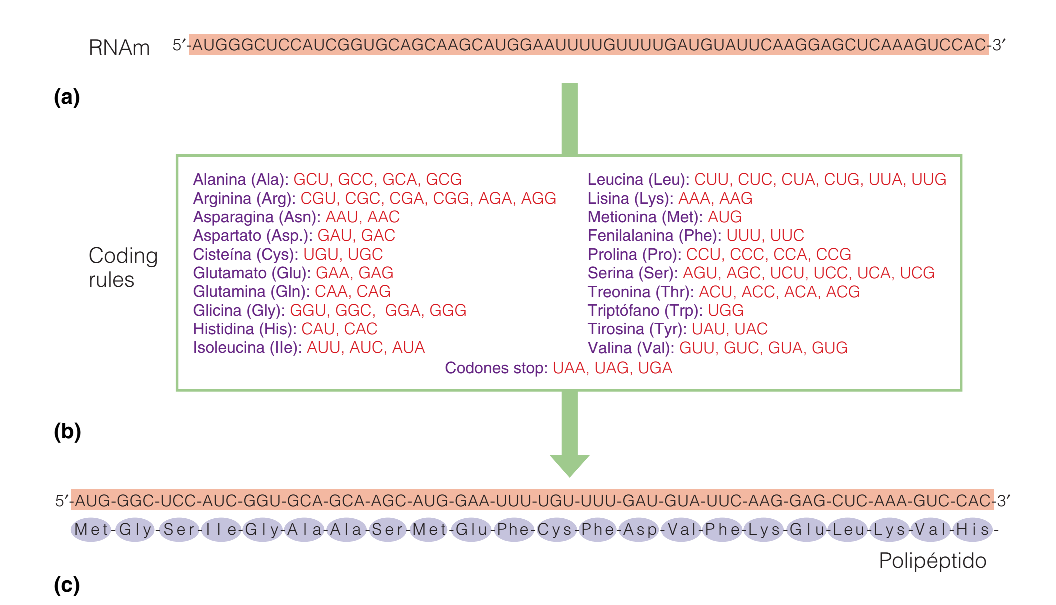


Figura 21.2 **Una primera aproximación al código genético.** El código genético es un sistema de purinas y pirimidinas usadas para enviar mensajes del genoma a los ribosomas. (**a**) Un mensaje escrito como una secuencia de nucleótidos en una molécula de mRNA no tiene un significado obvio hasta (**b**) que se utilizan un conjunto de reglas del código genético para convertir la secuencia en (**c**) la secuencia de aminoácidos de un polipéptido reconocible —en este caso, los primeros 22 aminoácidos de los 385 de la ovoalbúmina, la proteína mayoritaria de la clara del huevo—. (El código genético se muestra de una forma más convencional en la Figura 21.8.)

proteínas que la célula puede utilizar. Hasta que fue descifrado a principios de los años 60, el código genético fue un código secreto en un doble sentido: antes de que los científicos pudieran comprender la relación exacta entre la secuencia de bases de la molécula de DNA y la secuencia de aminoácidos de las proteínas, tenían que haber tomado conciencia de que existía dicha relación. Esta toma de conciencia surgió a partir del descubrimiento de que las mutaciones en el DNA podían provocar cambios en las proteínas.

Unos experimentos con Neurospora revelaron que los genes pueden codificar enzimas

El nexo entre las mutaciones génicas y las proteínas lo detectaron experimentalmente por primera vez George Beadle y Edward Tatum a principios de los años 40, usando el moho común del pan, *Neurospora crassa. Neurospora* es un organismo relativamente autosuficiente que puede crecer en un *medio mínimo* que contiene sólo azúcar, sales inorgánicas y la vitamina biotina. A partir de estos pocos ingredientes, las rutas metabólicas de *Neurospora* producen todo lo que requiere este organismo. Para investigar la influencia de los genes en estas rutas metabólicas, Beadle y Tatum trataron un cultivo de *Neurospora* con rayos X para introducir mutaciones génicas. Estos tratamientos generaron cepas mutantes que habían perdido la capacidad de desarrollarse en medio mínimo, aunque podían crecer en un *medio completo* suplementado con distintos aminoácidos, nucleósidos y vitaminas.

Estas observaciones sugieren que los mutantes de *Neurospora* habían perdido la capacidad de sintetizar ciertos aminoácidos y vitaminas y podían sobrevivir sólo cuando se añadían estos nutrientes al medio mínimo. Para determinar exactamente qué nutrientes se requerían, Beadle y Tatum transfirieron los organismos mutantes a distintos medios de cultivo, cada uno de los cuales contenía un aminoácido o vitamina como suplemento al medio mínimo. Este procedimiento llevó al descubrimiento de que una de las cepas mutantes sólo crecería en un medio suplementado con vitamina B_6, otro de los mutantes sólo crecería cuando el medio estuviese suplementado con el aminoácido arginina y así hasta cuatro cepas mutantes. Posteriormente se caracterizaron un gran número de mutantes distintos, cada uno de ellos incapaz de sintetizar un aminoácido o vitamina concreta.

Dado que los aminoácidos y las vitaminas son sintetizados en rutas metabólicas que implican muchas etapas, Beadle y Tatum se propusieron identificar la etapa en que cada ruta se había vuelto defectiva. Para llevar esto a cabo, suplementaron el medio mínimo con precursores metabólicos de un aminoácido o vitamina concreta, en lugar de con los propios aminoácidos o vitaminas. Conociendo qué precursor permite el crecimiento de cada cepa mutante, pudieron establecer que, para cada mutación, estaba afectado un paso concreto (catalizado enzimáticamente) de la síntesis de un compuesto específico. En otras palabras, había una correspondencia uno a uno entre cada mutación y la pérdida de actividad de una enzima de la ruta bioquímica. A partir de estos descubrimientos, Beadle y Tatum formularon la hipótesis de *un gen una enzima*, que establecía que cada gen controla la producción de una enzima concreta.

Transcripción inversa, retrovirus y retrotransposones

La transcripción generalmente tiene lugar en la dirección descrita por el dogma central, en la que el DNA sirve como molde para la síntesis del RNA. Sin embargo, en ciertos casos, el proceso puede ser a la inversa y el RNA puede funcionar como molde para la síntesis de DNA. Este proceso de *transcripción inversa* está catalizado por la enzima **transcriptasa inversa**, descubierta por primera vez en ciertos virus con genomas de RNA por Howard Temin y David Baltimore. Los virus que llevan a cabo la transcripción inversa se denominan **retrovirus**. Algunos ejemplos de retrovirus incluyen algunos patógenos importantes, como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), causante del SIDA, y algunos otros virus que causan cáncer en animales.

Retrovirus

La Figura 21 A.1 representa el ciclo reproductivo de un retrovirus típico. En la partícula viral hay dos copias del RNA genómico, encapsuladas por la proteína de la cápsida y rodeadas por una envuelta membranosa. Cada copia de RNA tiene asociada una molécula de la transcriptasa inversa. Primero el virus se une (①) a la superficie de la célula huésped y su envuelta se fusiona con la membrana plasmática, liberando la cápsida y su contenido en el citoplasma. Una vez dentro de la célula, la transcriptasa inversa viral (②) cataliza la síntesis de una cadena de DNA que es complementaria del RNA viral y después (③) cataliza la formación de una segunda cadena de DNA complementaria de la primera. El resultado es una versión del genoma viral en DNA de doble cadena. (④). Este DNA de doble cadena entra después en el núcleo y se integra en el DNA cromosómico de la célula huésped de la misma forma que el genoma de los fagos lisogénicos se integra en el cromosoma bacteriano (Caja 18A). Como un profago, el genoma viral integrado, denominado *provirus*, se replica cada vez que la célula replica su propio DNA. (⑤) La transcripción del DNA proviral (por enzimas celulares) produce tránscritos de RNA que funcionan de dos formas. Primero sirven como (⑥) moléculas de mRNA que dirigen la síntesis de proteínas virales (proteína de la cápsida, proteína de la envuelta y transcriptasa inversa). En segundo lugar (⑦) algunos de estos mismos tránscritos se empaquetan con proteínas virales para dar lugar a nuevos virus. (⑧) Los nuevos virus «brotan» de la membrana plasmática sin matar necesariamente a la célula.

La capacidad del genoma viral para integrarse en la célula huésped ayuda a explicar cómo algunos retrovirus causan cáncer. Estos virus, denominados virus tumorales RNA, son de dos tipos.

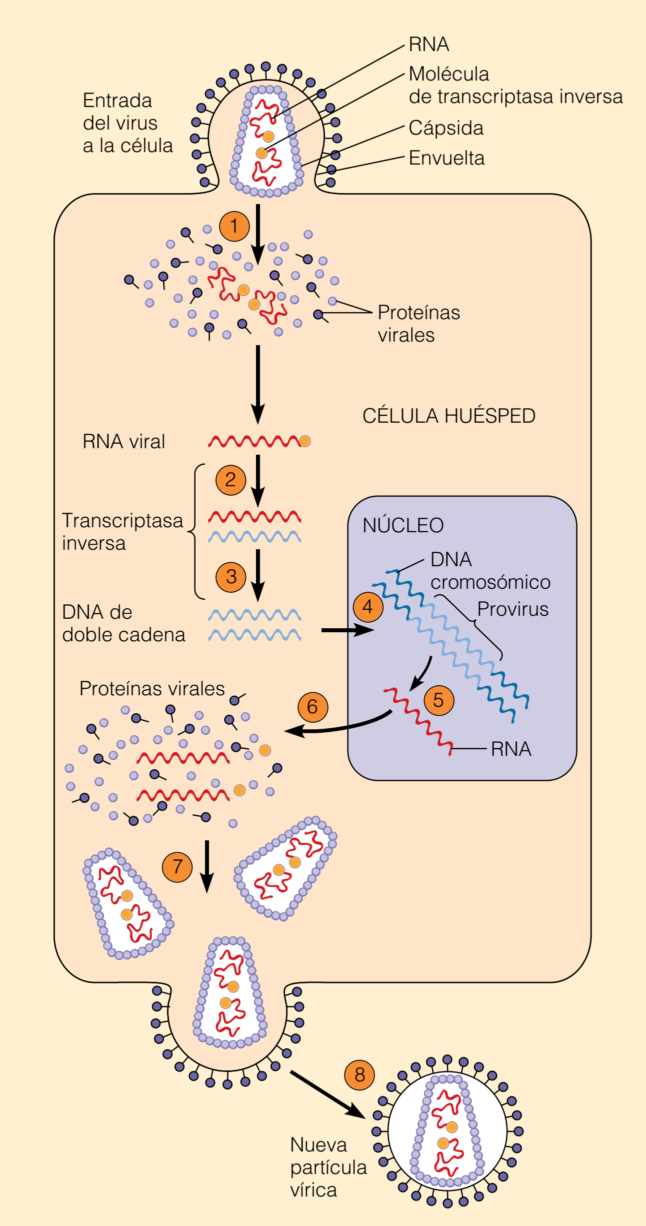


Figura 21A.1 El ciclo reproductivo de un retrovirus.

Los virus del primer tipo llevan un *oncogén* responsable del cáncer en sus genomas junto con los genes que codifican las

La mayoría de los genes codifican secuencias de aminoácidos de cadenas polipeptídicas

La teoría de que los genes dirigen la producción de enzimas representó un avance importante para la comprensión de los mecanismos de acción de los genes, pero no aclaró mucho sobre la cuestión de cómo los genes podían llevar a cabo esta función. La primera pista sobre el mecanismo subyacente surgió pocos años más tarde en el laboratorio de Linus Pauling, que estaba estudiando una enfermedad hereditaria, la anemia falciforme. Los glóbulos rojos de los individuos que sufren esta enfermedad presentan un as-

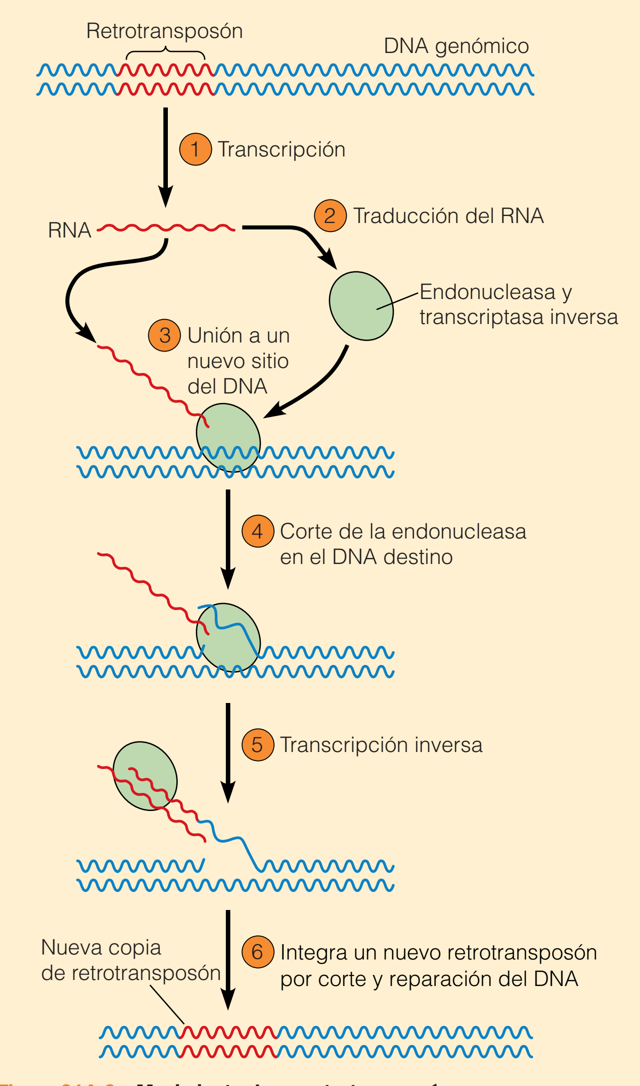


Figura 21A.2 Movimiento de un retrotransposón.

proteínas virales. Como veremos en el Capítulo 24, un oncogén es una versión mutada de un gen celular normal (un protooncogén) que codifica proteínas que regulan el crecimiento y la división celular. Por ejemplo, el oncogén que lleva el virus del sarcoma de Rous (el primer virus tumoral de RNA descubierto y que afecta al pollo) es una versión modificada del gen celular de la proteína quinasa. La proteína producto de este gen viral es hiperactiva y la célula no puede controlarla de forma normal. Como resultado, las células que expresan este gen proliferan rápidamente, produciendo un tumor canceroso denominado *sarcoma*. Los virus tumorales de RNA del segundo tipo no llevan oncogenes en sí mismos pero la integración de sus genomas en el cromosoma de la célula huésped altera el DNA celular de forma que un protooncogén normal se transforma en un oncogén.

Retrotransposones

La transcripción inversa también se da en células eucariotas normales en ausencia de una infección vírica. La mayoría de las veces implica a elementos de DNA denominados **retrotransposones.** En el Capítulo 18 vimos que los *transposones* son segmentos de DNA que pueden desplazarse de un lugar a otro del genoma. Los retrotransposones son un tipo especial de transposones que llevan a cabo la transcripción inversa para moverse. Como se señala en la Figura 21A.2, el mecanismo de transposición empieza con ① la transcripción del retrotransposón de DNA seguido de ② la traducción del RNA resultante, que produce una proteína con actividad endonucleasa y actividad transcriptasa inversa ③. Después, el RNA retrotransposón y la proteína se unen al DNA cromosómico en otra localización ④ y la endonucleasa corta una de la cadenas de DNA ⑤. La transcriptasa inversa usa después el RNA retrotransposón como molde para generar una copia de DNA que ⑥ se integra en el sitio de destino del DNA.

Aunque los retrotransposones no se transponen muy frecuentemente, se pueden encontrar en un alto número de copias en un genoma. Vimos un ejemplo en el Capítulo 18 —la familia de secuencias Alu—. Las secuencias Alu tienen sólo 300 pares de bases y no codifican para una transcriptasa inversa, pero usando una transcriptasa inversa codificada en cualquier otro lugar del genoma, han difundido copias de sí mismas por los genomas de humanos y otros primates. El genoma humano contiene alrededor de un millón de secuencias Alu que en conjunto representan aproximadamente un 11% del DNA total. Existe otro tipo de retrotransposón, denominado *elemento L1*, incluso más prevalente, que supone alrededor del 17% del DNA humano. El retrotransposon L1 es más largo que Alu y codifica para sus propias transcriptasa inversa y endonucleasa, como se representa en la Figura 21A.2. La razón por la cual los genomas retienen tantas copias de secuencias de retrotransposones como L1 y Alu no se conoce bien, pero se cree que tiene valor evolutivo, contribuyendo a la flexibilidad y variabilidad del genoma.

pecto anormal, con forma de «hoz» que hace que las células queden atrapadas y dañadas en su paso a través de los vasos sanguíneos pequeños (Figura 21.3). Intentando identificar la razón de esta observación, Pauling decidió analizar las propiedades de la hemoglobina, la proteína mayoritaria en los glóbulos rojos. Dado que la *hemoglobina* es una molécula cargada, usó la técnica de *electroforesis*, que separa unas moléculas cargadas de otras sometiéndolas a un campo eléctrico. Pauling encontró que la hemoglobina de los glóbulos falciformes migraba a distinta velocidad que la hemoglobina normal, lo que sugería que las dos proteínas presentaban distinta carga eléctrica. Ya que

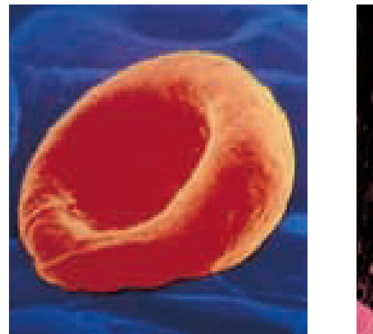




Figura 21.3 **Eritrocitos normales y falciformes.** La micrografía de la derecha revela la forma anormal de una célula falciforme. Esta forma distorsionada, que está causada por una forma mutante de la hemoglobina, hace que las células falciformes queden atrapadas y se dañen al pasar a través de los vasos sanguíneos (MEBs).

algunos aminoácidos presentan cadenas laterales cargadas, Pauling propuso que la diferencia entre la hemoglobina normal y la de las células falciformes radicaba en su composición distinta de aminoácidos.

Para probar esta hipótesis, parecía necesario conocer la secuencia completa de aminoácidos de la hemoglobina. La proteína más larga que se había secuenciado a principios de los años 50, coincidiendo con el descubrimiento de Pauling, era de menos de la décima parte del tamaño de la hemoglobina, de manera que determinar la secuencia completa de aminoácidos de la hemoglobina hubiese sido un trabajo monumental. Afortunadamente, un atajo ingenioso ideado por Vernon Ingram hizo posible identificar la anormalidad en los aminoácidos de la hemoglobina de los eritrocitos falciformes sin tener que determinar la secuencia completa de aminoácidos. Ingram utilizó la proteasa tripsina para cortar la hemoglobina en péptidos que después se separaron como se muestra en la Figura 21.4.

Figura 21.4 **Patrones peptídicos de la hemoglobina normal y la de las células falciformes.** En estos experimentos, llevados a cabo por Vernon Ingram, se digirió la hemoglobina en fragmentos peptídicos, utilizando la proteasa tripsina. Los fragmentos peptídicos se separaron después por electroforesis y más tarde por cromatografía en capa fina (una técnica en la que se permite ascender por capilaridad a un solvente por una hoja de papel). Las fotografías muestran el patrón de péptidos obtenido para la hemoglobina normal y la de las células falciformes. Los puntos coloreados en los dibujos de cada fotografía indican las regiones donde difieren los dos patrones. El fragmento alterado en la hemoglobina de las células falciformes contiene un aminoácido alterado (valina en lugar de ácido glutámico).

Cuando Ingram examinó los patrones de los péptidos de la hemoglobina normal y la anormal, descubrió que sólo uno de los péptidos era distinto en las dos proteínas. El análisis de los péptidos alterados reveló que un ácido glutámico de la hemoglobina normal había sido sustituido por una valina en la hemoglobina de los eritrocitos falciformes. Ya que el ácido glutámico está cargado negativamente y la valina es neutra, esta sustitución explica la diferencia en el comportamiento electroforético entre la hemoglobina normal y la anormal observada originalmente por Pauling.

Este simple cambio de ácido glutámico por valina (causado por el cambio de una sola base en el DNA) es suficiente para alterar el modo en que las moléculas de hemoglobina se empaquetan en los eritrocitos. La hemoglobina normal tiene una consistencia gelatinosa, pero la hemoglobina de los eritrocitos falciformes tiende a formar una especie de cristal cuando libera oxígeno y recogen dióxido de carbono de los tejidos. El conjunto de cristales deforma el eritrocito dándole una forma de hoz que bloquea el flujo sanguíneo a través de los capilares conduciendo a una enfermedad debilitante y potencialmente mortal.

Después del descubrimiento de Ingram de que una mutación génica altera un simple aminoácido en la hemoglobina de las células falciformes, estudios posteriores revelaron la existencia de otras formas anormales de la hemoglobina, algunas de las cuales implican mutaciones en genes diferentes. Existen dos genes distintos capaces de influir en la secuencia de aminoácidos de la misma proteína porque la hemoglobina es una proteína compuesta por diversas subunidades que contiene dos tipos distintos de cadenas polipeptídicas. Las secuencias de aminoácidos de los dos tipos de cadenas, denominadas α y β, están especificadas por dos tipos diferentes de genes.

Los descubrimientos de Pauling e Ingram hicieron necesaria la revisión del concepto de «un gen una enzima», de Beadle y Tatum. Primero, el hecho de que la hemoglobina no es una enzima, indica que los genes codifican para las secuencias de aminoácidos de las proteínas en general, no sólo de las enzimas. Además, el descubrimiento de que las cadenas α y β de la hemoglobina están codificadas por genes distintos, revela que cada gen codifica la secuencia de una cadena polipeptídica y no necesariamente de una proteína completa. Así, la hipótesis original se redefinió como *la teoría de un gen, un polipéptido.* De acuerdo con esta teoría, la secuencia de nucleótidos de un gen determina la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica.

A mediados de los años 60, esta predicción se confirmó en el laboratorio de Charles Yanofsky, donde se determinaron las localizaciones de docenas de mutaciones en el gen bacteriano que codifica una subunidad de la enzima triptófano sintasa. Como se predijo, las posiciones de las mutaciones dentro del gen correlacionaban con las posiciones de las sustituciones en la cadena polipeptídica de la triptófano sintasa (Figura 21.5).



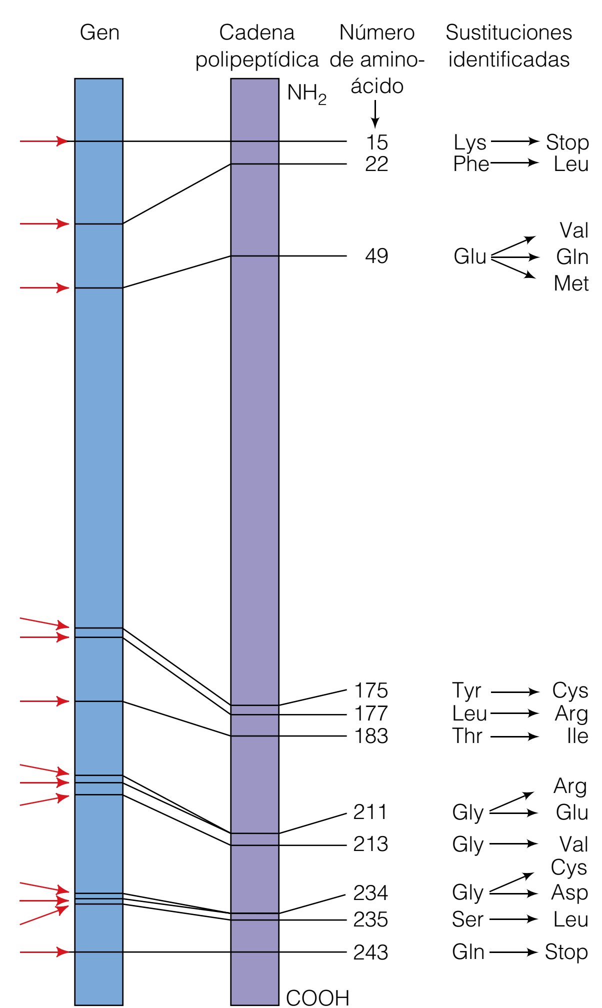


Figura 21.5 Relación entre las mutaciones de un gen y las sustituciones en los aminoácidos de la proteína producto. En estos datos acerca del gen de la triptófano sintasa bacteriana, el orden lineal de las mutaciones del gen (flechas rojas) corresponden a la secuencia lineal de alteraciones de los aminoácidos de la cadena polipeptídica. Los lugares donde se encuentran las mutaciones en el gen y en el polipéptido no se ajustan de forma precisa porque los sitios de mutación en el gen se localizaron usando frecuencias de recombinación génica que no permiten localizar exactamente la localización en una secuencia base de DNA.

El descubrimiento de que la secuencia de bases de un gen especifica la secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica fue un hito, pero los experimentos posteriores han revelado que la función de los genes es más compleja que esto, especialmente en los eucariotas. Como veremos en el próximo capítulo, la mayoría de los genes eucariotas contienen secuencias no codificantes intercaladas entre las secuencias codificantes y por lo tanto no presentan una correspondencia lineal completa con su producto polipeptídico. Es más, las secuencias codificantes contenidas en estos genes se pueden leer en varias combinaciones que dan lugar a distintos mRNA, que codifican

para cadenas polipeptídicas distintas. Este fenómeno, denominado *ayuste (splicing) alternativo del RNA*, permite que a partir de un solo gen puedan formarse docenas o incluso cientos de polipéptidos distintos.

Para complicar más nuestra descripción de la función de los genes, hay varios tipos de genes que no producen ningún tipo de cadena polipeptídica. Estos genes codifican moléculas de RNA como los RNA de transferencia, RNA ribosómico, RNA nucleolar pequeño y microRNA, cada uno de los cuales tiene una función celular única. Así, la visión un gen, un polipéptido, referida a la función génica ha quedado obsoleta, sustituida por una visón más amplia en la que los genes se presentan como unidades funcionales de DNA que codifican la secuencia de aminoácidos en más de una cadena polipeptídica, o alternativamente, varios tipos de RNA que llevan a cabo otras funciones además de especificar la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos.

El código genético es un código de tripletes

Una vez establecida la relación de secuencias de DNA y de proteínas, la siguiente cuestión es: ¿Cuántos nucleótidos del DNA se necesitan para especificar cada aminoácido en una proteína? Sabemos que la información en el DNA debe estar en la secuencia de los cuatro nucleótidos que constituyen el DNA: A, T, G y C. Éstas son las únicas «letras» del alfabeto del DNA. Dado que el lenguaje del DNA tiene que contener al menos 20 «palabras», una para cada uno de los 20 aminoácidos que se encuentran en las moléculas de proteína, la palabra de DNA que codifica cada aminoácido debe constar de más de un nucleótido. Un código de dobletes que implicara dos nucleótidos adyacentes no sería adecuado ya que cuatro tipos de nucleótidos tomados de dos en dos sólo generan $4^2 = 16$ combinaciones diferentes.

Sin embargo, con 3 nucleótidos por palabra, el número de palabras distintas que se pueden formar con un alfabeto de cuatro letras es $4^3 = 64$. Este número es más que suficiente para codificar 20 aminoácidos distintos. A principios de los años 50, estos argumentos matemáticos hicieron sospechar a los biólogos de la existencia de un código de tripletes, es decir, un código en el que se requerían tres pares de bases del DNA de doble cadena para especificar cada aminoácido en un polipéptido. Pero la evidencia directa de que el código se regía por tripletes no llegó hasta diez años más tarde. Para comprender la naturaleza de esta evidencia, primero tenemos que conocer las mutaciones de cambio de marco de lectura.

Mutaciones de cambio de lectura. En 1961, Francis Crick, Sydney Brenner y sus colegas dieron con la evidencia genética de la organización en tripletes del código genético estudiando los efectos mutagénicos del agente químico *proflavina* en el bacteriófago T4. Merece la pena tener en consideración su trabajo, no sólo porque aporta la evidencia crítica sobre la naturaleza del código genético sino también por la ingenuidad del razonamiento deductivo necesario para comprender el significado de sus observaciones.

La proflavina es uno de los *colorantes de acridina* utilizados comúnmente como mutágenos (agentes inductores de mutación) para la investigación en genética. Las acridinas son mutágenos interesantes porque actúan causando la adición o deleción de pares de bases del DNA. A veces, los mutantes de un virus salvaje («normal») u otro organismo, generados por el tratamiento con acridina, parecen revertir a la forma salvaje cuando se les trata con más cantidad del mismo tipo de mutágeno. Un examen más exhaustivo suele revelar, sin embargo, que la reversión no es verdaderamente una inversión de la mutación original, sino la adquisición de una segunda mutación que se localiza muy cerca de la primera. De hecho, las dos mutaciones están en el mismo gen, y si se separan por recombinación genética cada una da lugar a un fenotipo mutante.

Estas mutaciones representan una clase interesante de aritmética. Si se denomina a la primera alteración, mutación más (+), se puede denominar a la segunda mutación menos (−). Por sí mismas, cada una genera un fenotipo mutante pero cuando se dan juntas como doble mutación, se cancelan entre sí y el virus u organismo presenta un fenotipo normal, salvaje. (Para decirlo apropiadamente, el fenotipo se denomina *pseudo salvaje* ya que a pesar de su apariencia salvaje, presenta dos mutaciones.) Este comportamiento se puede explicar usando la analogía de la Figura 21.6. Suponga que la línea 1 representa un «gen» salvaje escrito en un lenguaje que utiliza palabras de tres letras. Cuando «traducimos» la línea empezando por el principio y leyendo tres letras al mismo tiempo, el mensaje del gen es comprensible. Una mutación + consiste en la adición de una letra dentro del mensaje (línea 2). Puede parecer un cambio menor, pero dado que el mensaje siempre se lee en tres letras a un tiempo, la inserción de una letra al principio de la secuencia supone que todas las letras restantes se leen fuera de fase. En otras palabras, se produce un desplazamiento en el marco de lectura y el resultado es un mensaje confuso desde el punto de inserción en adelante. Una mutación menos (−) se puede explicar de forma similar porque la deleción de una sola letra también causa el desplazamiento en el marco de lectura, lo que da lugar a otro mensaje confuso (línea 3). Estas **mutaciones de cambio de marco de lectura** son los típicos efectos de los colorantes de acridina y otros mutágenos que causan inserción o deleción de pares de bases individuales.

Individualmente, las mutaciones + y − siempre cambian el marco de lectura generando un mensaje confuso. Pero cuando una mutación + y una − se dan en el mismo gen, pueden a la larga cancelar sus efectos entre sí, especialmente cuando están situadas muy cerca. La inserción causada por la mutación + compensa la deleción causada por la mutación − y el mensaje es inteligible a partir de ese

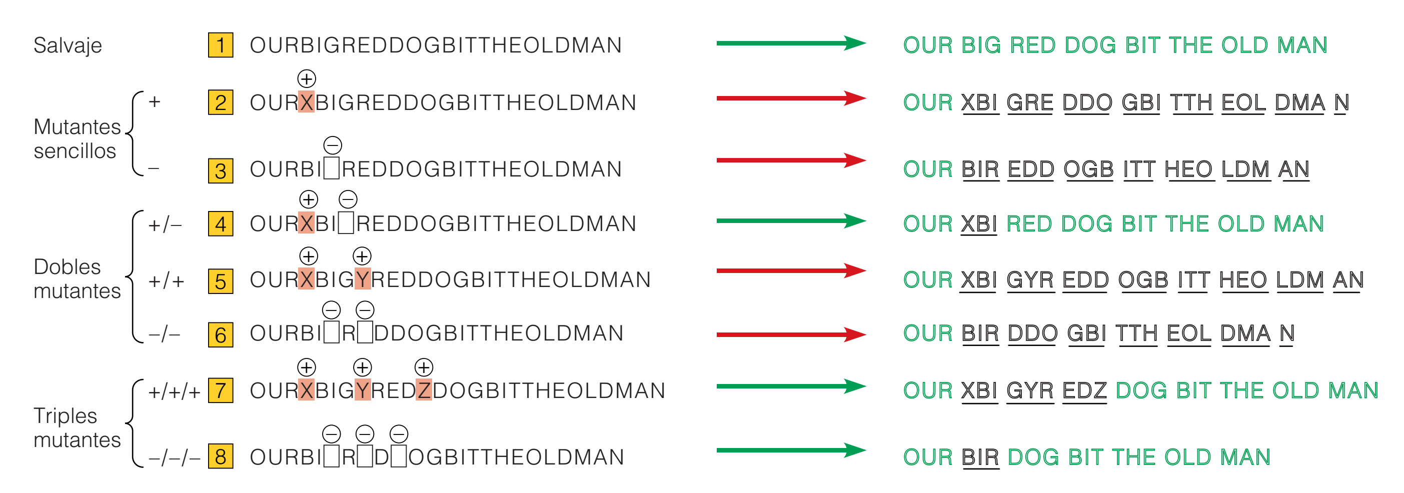


Figura 21.6 Mutaciones de cambio de marco de lectura. El efecto de las mutaciones de cambio de lectura se puede ilustrar con una frase en inglés (OUR BIG RED DOG BIT THE OLD MAN, construida con palabras de tres letras y cuya traducción es NUESTRO GRAN PERRO ROJO MORDIÓ AL HOMBRE MAYOR). La frase original (salvaje, línea 1) consta de palabras de tres letras. Cuando se lee en el marco de lectura correcto, es totalmente comprensible. La inserción (línea 2) o deleción (línea 3) de una sola letra desplaza el marco de lectura y tergiversa el mensaje desde ese punto en adelante (las palabras confusas debidas a desplazamientos del marco de lectura no puntúan). Los dobles mutantes que contienen una deleción que cancela una inserción previa vuelven a tener el marco de lectura original desde el punto de la segunda mutación en adelante (línea 4). Sin embargo, las dobles inserciones (línea 5) o dobles deleciones (línea 6) producen mensajes confusos. Las triples inserciones (línea 7) o la deleciones (línea 8) confunden parte del mensaje pero regeneran el marco de lectura con la adición o deleción neta de una palabra concreta.

punto (línea 4). Observe, sin embargo, que mutaciones dobles con dos adiciones (+/+; línea 5) o dos deleciones (−/−; línea 6) no se cancelan de la forma expuesta. Permanecen fuera de fase durante el resto del mensaje.

Evidencia de código en tripletes. Cuando Crick y Brenner generaron mutantes del fago T4 con proflavina, obtuvieron resultados similares a los del ejemplo hipotético de la Figura 21.6, que implican un lenguaje que utiliza palabras de tres letras. Encontraron que los mutantes, que tenían fenotipos anormales, podían adquirir una segunda mutación que les hacía revertir al fenotipo salvaje (o más apropiadamente, pseudo-salvaje). La segunda mutación era siempre una mutación + localizada en un sitio distinto, pero muy próximo, al de la mutación − original. En otras palabras, el fago que revirtió a fenotipo salvaje presentaba un patrón de mutaciones −/+. Crick y Brenner observaron en sus experimentos muchos ejemplos de mutantes −/+ (o +/−) que presentaban un fenotipo salvaje. Pero cuando generaron dobles mutantes +/+ o −/− por recombinación, nunca observaron fenotipos salvajes.

Crick y Brenner construyeron también mutantes triples de los mismos tipos (+/+/+ o −/−/−) y encontraron que muchos de ellos revirtieron a fenotipos salvajes. Este descubrimiento, por supuesto, se puede comprender rápidamente consultando las líneas 7 y 8 de la Figura 21.6: El marco de lectura (basado en palabras de tres letras) al principio y al final de ese hipotético mensaje sigue siendo el mismo cuando se añaden o eliminan tres letras. La parte del mensaje entre la primera y la tercera mutación es confusa, pero si están suficientemente cerca entre sí, se mantiene una parte suficiente de la expresión como para que el mensaje sea inteligible.

Aplicando este concepto de un código de tres letras al DNA, Crick y Brenner concluyeron que añadiendo o delecionando un solo par de bases se produciría un desplazamiento en el marco de lectura del gen, desde el punto afectado en adelante, y un segundo cambio similar desplazaría de nuevo el marco de lectura. Así, desde el lugar de la mutación en adelante, el mensaje es confuso. Pero un tercer cambio del mismo tipo, restituiría el marco de lectura original y el único segmento del gen traducido incorrectamente sería el segmento comprendido entre la primera y la tercera mutación. Estos errores son aceptables cuando el mensaje genético se traduce en una secuencia de aminoácidos de una proteína, suponiendo que la región afectada es corta y que los cambios en los aminoácidos de la secuencia no afectan a la función de la proteína. Ésta es la razón por la que las mutaciones individuales de un mutante triple con fenotipo salvaje se localizan tan cerca entre sí. La secuenciación de los polipéptidos «salvajes» de estos mutantes triples confirmó que las secuencias de aminoácidos se encontraban ligeramente alteradas de la forma esperada.

Basándose en su descubrimiento de que los fenotipos salvajes se suelen mantener en presencia de adiciones (o deleciones) de tres pares de bases pero no en presencia de una o dos, Crick y Brenner concluyeron que los nucleótidos que componen el DNA se leen en grupos de tres. En otras palabras, el código genético es un código de tripletes en el que la lectura del mensaje comienza en un lugar específico (para asegurar el marco de lectura adecuado) y después se lee cada tres nucleótidos, de forma que cada tri-

plete se traduce en el aminoácido adecuado hasta que se llega al final del mensaje. Tenga en cuenta que para establecer la naturaleza del código de tripletes, Crick y Brenner no disponían de la Figura 21.6 para ayudarles. Su capacidad para deducir la explicación correcta a partir de sus análisis de mutaciones inducidas por la proflavina es un ejemplo inspirador del razonamiento prudente e ingenioso que suele acompañar a los avances importantes en ciencia.

El código genético es degenerado y no superpuesto

A partir del hecho de que muchos de sus triples mutantes eran viables, Crick y Brenner llegaron a otra conclusión: la mayoría de los 64 posibles tripletes de nucleótidos deben codificar para aminoácidos, incluso en proteínas que sólo tienen los 20 tipos distintos de aminoácidos. Si sólo 20 de las 64 posibles combinaciones de nucleótidos «tienen sentido» para la célula, los cambios a tripletes sin sentido que aparecen en las zonas fuera de fase tendrían una frecuencia muy alta. Estos tripletes seguramente interferirían con la síntesis de proteínas y los mutantes de cambio de marco de lectura revertirían a fenotipo salvaje con muy baja frecuencia.

Sin embargo, Crick y Brenner detectaron reversión al fenotipo salvaje con frecuencia, de forma que concluyeron que la mayor parte de los 64 posibles tripletes deberían codificar aminoácidos. Ya que existen sólo 20 aminoácidos, esto les indicaba que el código genético es **degenerado** —es decir, que un aminoácido dado puede estar codificado por más de un triplete—. A pesar de la connotación peyorativa de esa palabra, la degeneración no implica fallo. Por el contrario, la degeneración tiene una función útil para incrementar la adaptabilidad del código. Si sólo existiesen 20 tripletes en el código (uno por cada uno de los 20 aminoácidos) cualquier mutación en el DNA que diese lugar a cualquiera de los 44 tripletes restantes interrumpiría el mensaje genético en ese punto, de forma que la susceptibilidad del sistema a la interrupción del mensaje sería muy elevada.

Una conclusión adicional del trabajo de Crick y Brenner —que nosotros asumimos implícitamente— es que el código genético *no solapa*. En un código superpuesto o que solape, el marco de lectura avanzaría sólo uno o dos nucleótidos cada vez a lo largo de la cadena de DNA, de forma que cada nucleótido se leería dos o tres veces. La Figura 21.7 compara un código no superpuesto con un código superpuesto en el que el marco de lectura avanza un nucleótido cada vez. Con este código superpuesto, la inserción o deleción de un solo par de bases en el gen supondría la inserción o deleción de un aminoácido en un punto de la cadena polipeptídica y cambiaría varios aminoácidos adyacentes, pero no afectaría al resto del gen. Esto supone que si el código genético fuera superpuesto, Crick y Brenner no habrían observado sus mutaciones de cambio de marco de lectura. Así, sus resultados indican claramente la naturaleza no superpuesta del código genético: cada nucleótido es parte de uno, y sólo un triplete.

Es interesante saber que aunque el código genético siempre se traduce de forma no superpuesta, hay casos en los que un segmento particular de DNA se traduce en más de un marco de lectura. Por ejemplo, ciertos virus con genomas muy pequeños tienen genes superpuestos, como se descubrió por primera vez en 1977 para el fago ϕX174. En el DNA de este fago, un gen está totalmente incluido en otro y para complicar más el tema, un tercer gen ¡solapa con los anteriores! Los tres genes se traducen en distintos marcos de lectura. Seguramente resulta muy ventajoso para el fago tener un genoma lo más pequeño posible. También se encuentran ejemplos de genes superpuestos en bacterias. Como veremos en el Capítulo 23, algunos mRNA de procariotas codifican para más de un polipéptido; en estos casos, los genes a veces solapan en unos pocos nucleótidos con sus genes contiguos.

El RNA mensajero guía la síntesis de las cadenas polipeptídicas

Después de la publicación de los descubrimientos de Crick y Brenner en 1961, el descubrimiento del significado de los 64 tripletes del código genético llevó sólo cinco años. Antes de ver cómo se consiguió, permítanos describir el papel del RNA en el sistema codificado. El código genético, en la manera en que suele describirse, no se refiere al orden de los nucleótidos en el DNA de doble cadena, sino al orden en las moléculas de mRNA, que de hecho son las que sirven como molde para la síntesis de las proteínas. Como se indica en la Figura 21.7, las moléculas de mRNA se transcriben a partir del DNA mediante un sistema de apareamiento similar al de la replicación del DNA, pero con dos diferencias importantes.

(1) A diferencia de la replicación del DNA, en la que se copian las dos hebras de DNA, sólo una de las hebras de DNA —la **hebra molde**— sirve como molde para la formación de mRNA durante la transcripción. La hebra de DNA que no funciona como molde, aunque no está directamente implicada en la transcripción, recibe por convención el nombre de **hebra codificante** porque tiene una secuencia similar a la de las moléculas de mRNA de cadena sencilla que llevan el mensaje codificado.

(2) El mecanismo empleado para copiar la información de la secuencia de una cadena de DNA molde a una molécula de RNA sigue las mismas reglas de apareamiento de bases que la replicación del DNA, con la única excepción de que en el RNA se emplea la base uracilo (U) en los lugares del DNA donde se hubiera incorporado la timina (T). Esta sustitución está permitida porque tanto U como T pueden formar puentes de hidrógeno con la base A. Durante la replicación del DNA la base A se aparea con T, mientras en la transcripción la base A se aparea con U. De este modo, la secuencia de un mRNA no es exactamente la

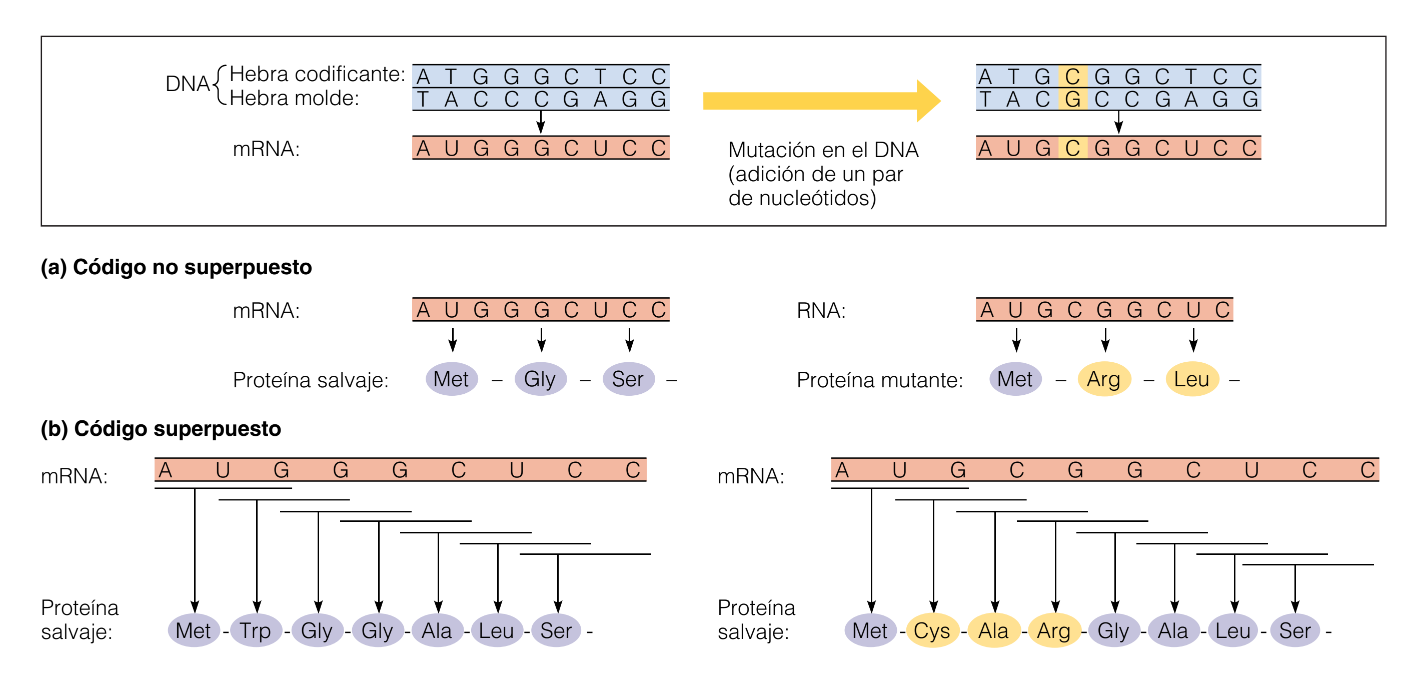


Figura 21.7 Efecto de la inserción de un par de nucleótidos en proteínas codificadas por códigos genéticos superpuestos y no superpuestos. Una hebra del DNA de doble cadena, representado en la parte superior, denominada hebra molde, se transcribe al segmento de nueve nucleótidos de mRNA representado, de acuerdo a las mismas reglas de apareamiento de bases que se usa en la replicación del DNA, excepto en que en el RNA se utiliza la base U en lugar de T. (La cadena de DNA complementaria, con una secuencia esencialmente idéntica a la del mRNA, se denomina *cadena codificante*). (**a**) Con un código no superpuesto, el marco de lectura avanza tres nucleótidos cada vez y este segmento de mRNA se lee como tres tripletes sucesivos, codificando los aminoácidos metionina, glicina y serina. (Ver las reglas del código de aminoácidos en las Figuras 21.2 o 21.8.) Si se muta el DNA de doble cadena por inserción de un solo par de nucleótidos (el par GC sombreado en amarillo en el recuadro superior), el mRNA tendrá un nucleótido adicional. Esta inserción altera el marco de lectura desde ese punto en adelante, de forma que el mRNA restante se lee incorrectamente y todos los aminoácidos son erróneos. En el ejemplo mostrado, la inserción tiene lugar cerca del principio del mensaje y el único parecido entre la proteína salvaje y la mutante es el primer aminoácido (metionina). (**b**) En un código superpuesto, el marco de lectura avanza sólo un nucleótido cada vez. Por lo tanto, la proteína salvaje contendrá tres veces más aminoácidos de los tendría la proteína generada por el mismo mRNA usando un código no superpuesto. De nuevo, la inserción de un par de nucleótidos daría lugar a una molécula de mRNA con un nucleótido extra. Sin embargo, en este caso, el efecto de la inserción en la proteína es más moderado; se sustituyen dos aminoácidos de la proteína salvaje por tres aminoácidos en la proteína mutante, pero el resto de la proteína queda igual. Crick y Brenner no hubieran encontrado en sus estudios las mutaciones de cambio de marco de lectura generadas con el agente mutagénico proflavina si el código genético fuese superpuesto. Así, sus datos indicaban que el código era no superpuesto.

misma que la de la hebra de DNA codificante, ya que el mRNA lleva la base U en los lugares en los que la hebra de DNA codificante tiene la base T.

¿Cómo sabemos que las moléculas de mRNA, producidas en el proceso de transcripción, son responsables del orden de los aminoácidos durante la síntesis de las proteínas? Marshall Nirenberg y J. Heinrich Matthei demostraron por primera vez esta relación en 1961, siendo pioneros en el uso de los *sistemas no celulares* para el estudio de la síntesis de proteínas. En estos sistemas, la síntesis de proteínas se puede estudiar fuera de células vivas mezclando ribosomas, aminoácidos, una fuente energética y un extracto que contenga componentes citoplasmáticos. Nirenberg y Matthei encontraron que añadiendo RNA a los sistemas no celulares se incrementaba la tasa de síntesis de proteínas, lo que planteaba la cuestión de si las moléculas de RNA añadidas estaban funcionando como mensajes que determinaban la secuencia de aminoácidos de las proteínas que se estaban sintetizando. Para contestar esta cuestión, decidieron añadir moléculas de RNA sintéticas con una composición de bases conocida al sistema no celular para ver si estas moléculas de RNA determinaban el tipo de proteína que se sintetizaba.

Sus primeros experimentos aprovecharon la capacidad de la enzima *polinucleótido fosforilasa* para sintetizar moléculas de RNA de una composición de bases predecible. A diferencia de las enzimas implicadas en la transcripción celular, la polinucleótido fosforilasa no requiere un molde porque sencillamente ensambla al azar los nucleótidos disponibles formando una cadena lineal. Si sólo se suministra uno o dos de los cuatro nucleótidos (ATP, GTP, CTP y UTP), la enzima sintetizará moléculas de RNA con una composición de bases restringida. Cuando sólo se utiliza un tipo de nucleótido se forma una molécula de RNA más sencilla ya que el único producto posible es un homopolímero de RNA que consta de un solo nucleótido repetido. Por ejemplo, cuando la polinucleótido fosforilasa se incuba con UTP como único sustrato, el producto es un homo-

polímero de uracilo, denominado poli(U). Cuando Nirenberg y Matthei añadieron poli(U) a un sistema de síntesis libre de proteínas observaron un marcado incremento en la incorporación a la cadena polipeptídica de un aminoácido en particular, la fenilalanina. Las moléculas sintéticas de RNA que contenían otras bases no estimulaban la incorporación de fenilalanina, mientras que poli(U) incrementaba sólo la incorporación de fenilalanina.

A partir de estas observaciones, Nirenberg y Matthei concluyeron que poli(U) dirige la síntesis de cadenas polipeptídicas que constan sólo de fenilalanina. Esta observación fue un hito en el desarrollo del concepto del RNA mensajero, ya que fue la primera demostración de que la secuencia de bases de una molécula de RNA determina el orden en que se unen los aminoácidos durante la síntesis de proteínas.

El diccionario de codones se estableció usando polímeros y tripletes de RNA sintético

Una vez que se habían determinado las funciones del RNA como mensajero que guía el proceso de síntesis de proteínas, quedaba por aclarar la naturaleza del sistema de codificación por tripletes. Los tripletes de nucleótidos del mRNA, denominados **codones**, son las verdaderas unidades de lectura para la maquinaria de traducción durante la síntesis de proteínas. Las cuatro bases presentes en el RNA son las purinas adenina (A) y guanina (G) y las pirimidinas citosina (C) y uracilo (U), de manera que los 64 codones son las 64 combinaciones posibles de esas cuatro «letras» tomadas de tres en tres. Ya que las moléculas de mRNA se sintetizan en dirección $5' \rightarrow 3'$ (como el DNA) y se traducen empezando por el extremo 5′, por convención los 64 codones se escriben en el orden $5' \rightarrow 3'$.

Estos codones del mRNA determinan los aminoácidos que se incorporarán durante la síntesis de las proteínas pero, ¿qué aminoácido codifica cada uno de los 64 codones? El descubrimiento de qué poli(U) determina la incorporación de fenilalanina durante la síntesis proteica permitió a Nirenberg y Matthei hacer la primera asignación de codón: el triplete UUU del mRNA debe codificar el aminoácido fenilalanina. Estudios posteriores de las propiedades codificantes de otros homopolímeros sintéticos, como poli(A) y poli(C) revelaron rápidamente que AAA codifica lisina y CCC codifica prolina. (Debido a complicaciones estructurales inesperadas, poli(G) no es un buen mensajero y no se testó.)

Después de ensayar los homopolímeros, se usó la polinucleótido fosforilasa para generar copolímeros que tuvieran una mezcla de dos tipos de nucleótidos, pero el resultado fue más difícil de interpretar. Por ejemplo, el copolímero sintetizado incubando la polinucleótido fosforilasa con los precursores CTP y ATP contiene diversas A y C, pero no en un orden predecible. Este copolímero contiene ocho tipos distintos de codones: CCC, CCA, CAC, ACC, AAC, ACA, CAA y AAA. Cuando se utilizó este copolímero para sintetizar proteínas, los polipéptidos resultantes contenían seis de los 20 aminoácidos posibles. Los codones para dos de ellos (CCC y AAA) se conocían de los estudios con homopolímeros, pero los otros no se podían asignar inequívocamente a un aminoácido.

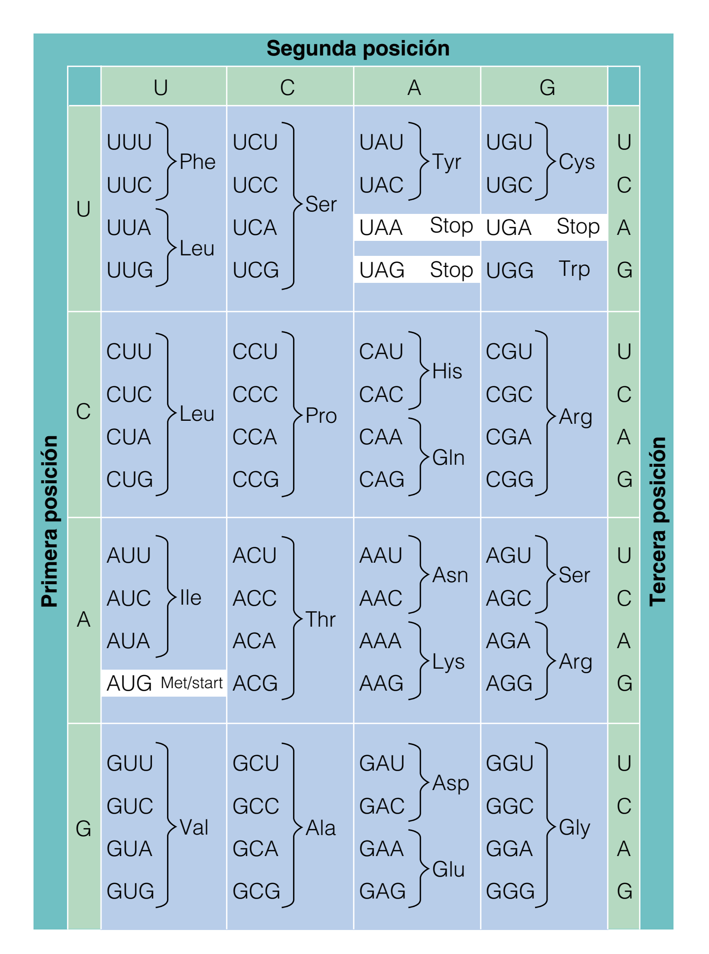
Los progresos posteriores dependieron de un significado alternativo a la asignación de codones dada por el grupo de Nirenberg. En lugar de utilizar polímeros largos, sintetizaron 64 moléculas de RNA muy cortas, de sólo tres nucleótidos. Estudiaron entonces qué aminoácido se unía al ribosoma en respuesta a cada uno de estos tripletes. (En estos experimentos, son las moléculas de tRNA las que llevan realmente los aminoácidos al ribosoma). Con estos experimentos fueron capaces de determinar la mayor parte de las asignaciones de codones.

Mientras tanto, en el laboratorio de H. Gobind Khorana se había desarrollado un método refinado de síntesis de polímeros. La aproximación de Khorana era muy parecida a la de Nirenberg y Matthei pero con la diferencia importante de que los polímeros de Khorana tenían secuencias definidas. Así, pudieron producir una molécula de mRNA sintética únicamente con la secuencia UAUA... Este copolímero de RNA tiene sólo dos codones, UAU y AUA, alternados en la secuencia. Cuando Khorana añadió su RNA particular a un sistema de síntesis no celular y libre de proteínas, se produjo un polipéptido que contenía sólo tirosina o isoleucina. Así, Khorana fue capaz de acotar las posibles asignaciones de los codones UAU y AUA a estos dos aminoácidos. Cuando se combinaron los resultados obtenidos con estos polímeros sintéticos con los estudios de unión de Nirenberg, se pudieron asignar sin ambigüedades la mayoría de los codones.

De los 64 codones posibles del RNA mensajero, 61 codifican aminoácidos

En 1966, sólo cinco años después de que se identificara el primer codón, los experimentos que hemos descrito permitieron asignar los 64 codones —es decir, se había descifrado todo el código genético, como se muestra en la Figura 21.8—. La interpretación del código confirmó varias propiedades que ya se habían deducido antes de forma indirecta. De hecho, los 64 codones se usaron para la traducción de mRNA; 61 de los 64 codones especificaban la incorporación de aminoácidos específicos a la cadena polipeptídica que estaba sintetizando, y uno de ellos (AUG) también tiene un papel fundamental **como codón de iniciación**, que determina el inicio de la síntesis de proteínas. Los tres codones restantes (UAA, UAG y UGA) son **codones stop** que determinan la terminación de la síntesis de la cadena polipeptídica.

Observando la Figura 21.8, queda claro que el código genético *no presenta ambigüedades*: cada codón tiene uno y sólo un significado. La figura también muestra que el códi-



Primera posición	Segunda posición: U	C	A	G	Tercera posición
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
U	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C
U	UUA Leu	UCA Ser	UAA Stop	UGA Stop	A
U	UUG Leu	UCG Ser	UAG Stop	UGG Trp	G
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
C	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C
C	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A
C	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
A	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C
A	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
A	AUG Met/start	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
G	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C
G	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A
G	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G

Figura 21.8. El código genético. Las «palabras» del código son codones de tres letras presentes en la secuencia de nucleótidos del mRNA, leídas en dirección 5′ ⟶ 3′. Las letras representan las bases nucleotídicas uracilo (U), citosina (C), adenina (A) y guanina (G). Cada codón determina un aminoácido o una señal de parada (stop). Para decodificar un codón, lea la primera letra del margen izquierdo, después busque la segunda letra a lo largo de esa fila y por último en el margen derecho se lee la tercera letra. Por ejemplo, el codón AUG representa la metionina. (Como veremos en el Capítulo 22, AUG también es una señal de inicio).

go genético es *degenerado*, es decir, la mayor parte de los aminoácidos son codificados por más de un codón. Por ejemplo, hay dos codones para la histidina (His), cuatro para la treonina (Thr) y seis para leucina (Leu). Aunque la degeneración puede sonar a «derroche», permite incrementar la adaptabilidad del código genético. Como ya mencionamos antes, si hubiera sólo un codón para cada uno de los 20 aminoácidos que se incorporan a las proteínas, entonces cualquier mutación en el DNA que supusiera la formación de cualquier otro codón podría paralizar la síntesis de la cadena polipeptídica en ese punto. Pero con un código degenerado la mayor parte de las mutaciones causarán simplemente cambios de codón que alterarán el aminoácido específico. El cambio funcional que supone la modificación de un solo aminoácido en una proteína no suele ser drástico y en algunos casos puede incluso resultar ventajoso. Es más, las mutaciones en la tercera base de un codón generalmente no cambian el aminoácido en absoluto, como puede ver en la Figura 21.8. Por ejemplo, una mutación que cambia el codón ACU a ACC, ACA o ACG no altera el aminoácido correspondiente, que es treonina en los cuatro casos.

La validez de las asignaciones de codones de la Figura 21.8 se ha confirmado analizando las secuencias de aminoácidos de proteínas mutantes. Por ejemplo, ya vimos al principio del capítulo que la hemoglobina de los eritrocitos falciformes difiere de la normal en la posición de un solo aminoácido, en la que la valina se sustituye por ácido glutámico. La tabla del código genético revela que el ácido glutámico puede estar codificado por GAA o GAG. Con cualquiera de estos tripletes, un solo cambio de base puede generar un codón para valina. Por ejemplo, GAA podría haber cambiado a GUA o GAG a GUG. En ambos casos, el codón de ácido glutámico se convertiría en un codón de valina. Se han estudiado muchas otras proteínas de la misma forma. En casi todos los casos, las sustituciones de aminoácidos corresponden a un único cambio de base en el triplete.

El código genético es (casi) universal

Una última propiedad destacable del código genético es su prácticamente total universalidad. Excepto en algunos casos, todos los organismos estudiados hasta ahora —procariotas y eucariotas— usan el mismo código genético. Incluso los virus, considerados como organismos no vivos, emplean el mismo código. En otras palabras, los 64 codones casi siempre determinan los mismos aminoácidos o codones stop que se muestran en la Figura 21.8, lo que sugiere que este sistema se estableció pronto en la historia de la vida en la tierra y ha permanecido inalterable durante billones de años de evolución.

Sin embargo, se han observado excepciones a las reglas generales del código en algunos casos, fundamentalmente en la mitocondria y en algunas bacterias y organismos unicelulares. En el caso de la mitocondria, que contiene su propio DNA y lleva a cabo sus propios procesos de transcripción y traducción, el código genético puede presentar varias diferencias respecto al código estándar. Una de las diferencias está en el codón UGA, que es un codón de terminación en el código estándar pero que se traduce como triptófano en las mitocondrias de mamíferos y levaduras. Por el contrario, AGA, que es un codón de terminación en la mitocondria de mamíferos, codifica arginina en la mayoría de los sistemas restantes (incluyendo la mitocondria de levaduras). Estas anomalías generan alteraciones en las propiedades del RNA de transferencia (tRNA) que se encuentran en la mitocondria. Como verán en el siguiente capítulo, las moléculas de tRNA tienen un papel fundamental en el código genético porque reconocen codones en el mRNA y llevan el aminoácido apropiado a cada codón

durante el proceso de síntesis de proteínas. Las diferencias en los tipos de tRNA presentes en la mitocondria parecen radicar en la capacidad de leer codones como UAG y AGA de forma distinta a la del código genético estándar.

En algunas bacterias, así como en los genomas nucleares de ciertos protozoos y hongos, también se emplean algunos codones de forma distinta. Por ejemplo, el hongo *Candida* produce un tRNA inusual que lleva serina a los mRNA que contienen el codón CUG en lugar de llevar el aminoácido esperado, leucina. En un caso especialmente interesante, observado en organismos tan diversos como bacterias y mamíferos, una variación del código genético permite seleccionar la incorporación del aminoácido inusual *selenocisteína*, en el que el átomo de azufre de la cisteína está sustituido por un átomo de selenio. En los mRNA que codifican algunas proteínas raras que contienen selenocisteína, el significado del codón UGA cambia de codón de terminación a codón que selecciona selenocisteína. En estos casos, el plegamiento de la molécula de mRNA genera codones UGA que se unen a tRNA especiales que llevan selenocisteína, en lugar de funcionar como codones de terminación que determinan el fin de la síntesis de proteínas. Recientemente se ha encontrado un mecanismo similar que permite a otro codón de terminación, UAG, seleccionar la incorporación del aminoácido *pirrolisina*.

La transcripción en células procariotas

Ahora que ya empieza a conocer el código genético que dirige la relación entre la secuencia de nucleótidos del DNA y la secuencia de aminoácidos de las proteínas, podemos estudiar los pasos específicos implicados en el flujo de información genética del DNA a la proteína. El primer paso de este proceso es la transcripción de una secuencia de nucleótidos del DNA en una secuencia de nucleótidos en el RNA. El RNA es similar químicamente al DNA, excepto en que como azúcar contiene ribosa en lugar de desoxirribosa, tiene la base uracilo (U) en lugar de timina (T) y normalmente es de cadena sencilla (*véase* Figura 3.17). Como en otras áreas de la genética molecular, los principios fundamentales de la síntesis del RNA se descubrieron primero en bacterias, donde las moléculas y mecanismos son relativamente sencillos. Por esta razón, empezaremos con la transcripción en procariotas.

La transcripción está catalizada por la RNA polimerasa, que sintetiza RNA usando DNA como molde

Las células bacterianas tienen un tipo de **RNA polimerasa** que sintetiza los tres tipos fundamentales de RNA —mRNA, tRNA y rRNA—. Las enzimas son bastante similares en las diferentes bacterias y la RNA polimerasa de *Escherichia coli* está especialmente bien caracterizada. La RNA polimerasa es una proteína grande que consta de dos subunidades α, dos subunidades β, que difieren lo suficiente como para ser identificadas como β y β', y una subunidad disociable denominada **factor sigma** (σ). Aunque el núcleo enzimático, que se encuentra en la subunidad sigma puede llevar a cabo la síntesis de RNA, se requiere la *holoenzima completa* ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$) para asegurar la iniciación en los sitios adecuados de la molécula de DNA. La subunidad sigma desempeña un papel fundamental en este proceso promoviendo la unión de la RNA polimerasa a secuencias específicas de DNA, denominadas *promotores,* que se encuentran al principio de los genes. Las bacterias contienen varios factores sigma distintos que inician selectivamente la transcripción de categorías específicas de genes, como veremos en el Capítulo 23. Una vez que el factor sigma ha llevado a la RNA polimerasa al promotor adecuado, el factor sigma se libera cuando empieza la transcripción.

La transcripción consta de cuatro pasos: unión, iniciación, elongación y terminación

La transcripción es la síntesis de una molécula de RNA cuya secuencia de bases es complementaria a la secuencia de bases de una hebra de DNA molde. La Figura 21.9 muestra una visión general de la transcripción, que se refiere tanto a procariotas como a eucariotas. Ilustra la síntesis de RNA de una **unidad transcripcional** sencilla, un segmento de DNA cuya transcripción da lugar a una molécula de RNA continua. El proceso de síntesis de RNA empieza con ①, la unión de la RNA polimerasa a un promotor de DNA que desencadena el desenrollamiento local de la doble hélice de DNA. Usando una de las dos cadenas de DNA como molde, la RNA polimerasa entonces ② inicia la síntesis de una cadena de RNA. Después de la iniciación, la RNA polimerasa se mueve a lo largo del DNA molde, desenrollando la doble hélice y ③ alargando al mismo tiempo la cadena de RNA. Durante este proceso, la enzima cataliza la polimerización de los nucleótidos en un orden determinado por el apareamiento de bases del DNA molde. Finalmente la enzima transcribe una secuencia de bases especial denominada señal de terminación, que finaliza ④ la síntesis de RNA y facilita la liberación de la molécula de RNA completa y la disociación de la polimerasa del molde.

Aunque la transcripción es un proceso complejo, se puede esquematizar en cuatro pasos; unión, iniciación, elongación y terminación. Ahora veremos cada paso en detalle, tal y como sucede en *E. coli*. Puede volver a la Figura 21.9 durante todo el desarrollo para ver cómo se ajusta cada paso al proceso global.

Unión de la RNA polimerasa al promotor. El primer paso en la síntesis del RNA es la unión de la RNA polimerasa al **sitio promotor** del DNA —una secuencia específica de varias

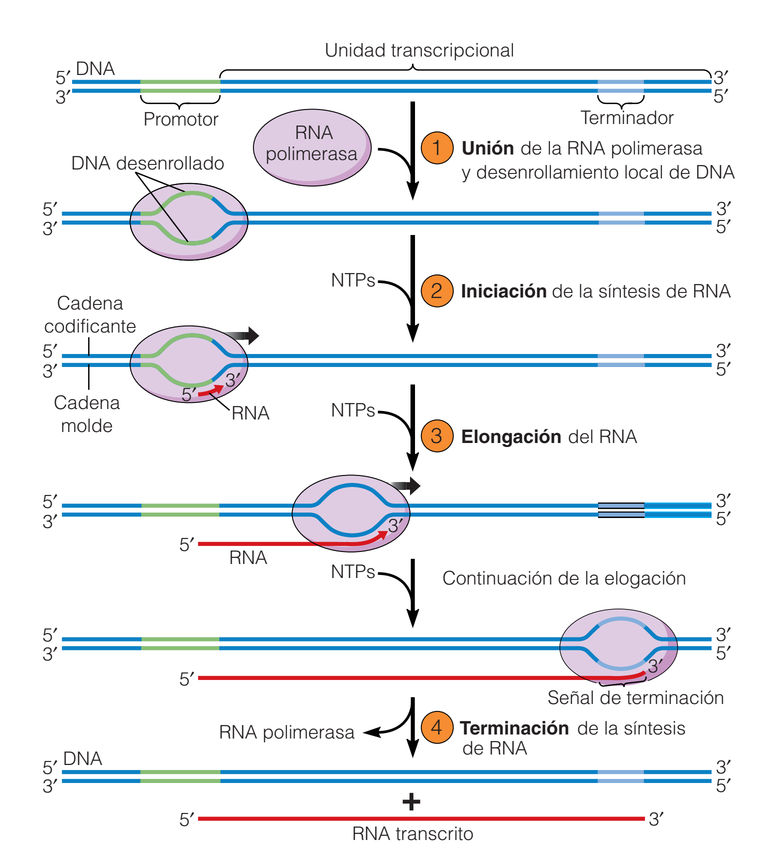


Figura 21.9 Una visión general de la transcripción. La transcripción del DNA tiene lugar en cuatro pasos: ① Unión de la RNA polimerasa al DNA en el promotor, ② iniciación de la transcripción de la hebra de DNA molde, ③ elongación de la cadena de RNA, y ④ terminación de la transcripción, acompañada por la liberación de la RNA polimerasa y el RNA completo producido a partir del DNA molde. La RNA polimerasa se mueve a lo largo de la cadena de DNA molde en dirección 3′ → 5′ y la molécula de RNA crece en dirección 5′ → 3′. El superenrollamiento generado por el desenrollamiento delante de la RNA polimerasa se contrarresta por acción de las topoisomerasas (no mostrado). El esquema general que se ilustra en esta figura se aplica tanto a la transcripción en procariotas como en eucariotas. NTPs (moléculas de ribonucleósido trifosfato) = ATP, GTP, CTP y UTP.

docenas de pares de bases que determina dónde empieza la síntesis de RNA y qué hebra de DNA sirve como molde—. Cada unidad transcripcional tiene un promotor localizado cerca del principio de la secuencia de DNA que se va a transcribir. Por convención, las secuencias promotoras se describen en la dirección 5′ → 3′ de la hebra codificante, que es la hebra opuesta al molde.

Los términos *corriente arriba* y *corriente abajo* se utilizan para referirse a las secuencias de DNA localizadas hacia el extremo 5′y 3′, respectivamente. Así, se dice que la región donde se localiza el promotor está corriente arriba de la secuencia transcrita. La unión de la RNA polimerasa al promotor está mediada por la subunidad sigma y genera el desenrollamiento de un tramo corto de DNA en el área donde empezará la transcripción, exponiendo las dos hebras de la doble hélice separadas.

Las secuencias promotoras se identificaron por huella de DNA, una técnica empleada para la localización de la región de DNA que se une a un dominio de unión a DNA de una proteína (Anexo 21B). Se han identificado también las secuencias esenciales de una región promotora delecionando o adicionando secuencias específicas a genes clonados bajo control de estas secuencias y observando si este DNA alterado puede ser transcrito por la RNA polimerasa. Estas técnicas han revelado que los promotores de DNA difieren significativamente entre las unidades transcripcionales bacterianas. Pero entonces, ¿cómo puede la RNA polimerasa reconocer a todas? El reconocimiento, la unión enzimática y su desactivación dependen sólo de varias secuencias muy cortas localizadas en posiciones concretas dentro de cada promotor; la identidad de los nucleótidos que forman parte del resto del promotor son irrelevantes para estas funciones.

La Figura 21.10 destaca las secuencias esenciales de un promotor procariota típico. El punto donde empezará la transcripción, denominado *punto de inicio*, casi siempre es una purina y suele ser adenina. Aproximadamente 10 bases corriente arriba del punto de inicio se encuentra la secuencia de seis nucleótidos TATAAT, denominada *secuencia −10* o *caja Pribnow*, en honor a su descubridor. Por convención, los nucleótidos se numeran desde el punto de inicio (+1), con números positivos hacia la derecha (corriente abajo) y negativos hacia la izquierda (corriente arriba). El nucleótido –1 está inmediatamente corriente arriba del punto de inicio (no es «0»). En la posición −35 o cerca de ella se encuentra la secuencia de seis nucleótidos TTGACA, denominada *secuencia −35*.

Las secuencias −10 y −35 (y sus posiciones relativas respecto al punto de inicio) se han conservado durante la evolución pero no son idénticas en todos los promotores bacterianos, ni siquiera en todos los promotores de un mismo genoma. Por ejemplo, la secuencia −10 del promotor de uno de los genes de tRNA de *E.coli* es TATGAT, mientras que la secuencia −10 de un grupo de genes nece-

Identificación en el DNA de sitios de unión a proteínas

La iniciación de la transcripción depende de las interacciones de las proteínas con secuencias específicas de DNA. En las células procariotas, la holoenzima RNA polimerasa reconoce y se une directamente a la secuencia promotora situada al inicio del gen. En las células eucariotas, deben unirse al promotor ciertos factores de transcripción antes de que la polimerasa pueda unirse. Y en todas las células, la regulación de la transcripción depende de la interacción de otras proteínas con sitios específicos de unión al DNA. Así, el investigador que se dedique al estudio de la transcripción debe conocer las proteínas y las secuencias de DNA a las que se unen.

La técnica de *huella de DNA (footprinting)* se ha usado para localizar los sitios de la secuencia de DNA a los que se unen las proteínas. El principio de esta técnica es que la unión de una proteína a una secuencia concreta de DNA debería proteger a esa secuencia de la degradación química o enzimática. En la Figura 21B.1 se emplea una enzima que degrada DNA, denominada DNasa I, que ataca a los puentes de hidrógeno entre los nucleótidos más o menos de forma aleatoria. En este ejemplo, el material de partida es un fragmento de DNA que se ha marcado en su extremo 5′ con fosfato radiactivo (indicado con estrellas).

En el paso ①, se mezcla primero una muestra del DNA radiactivo con la proteína de unión a DNA en estudio; otra muestra, sin la proteína, sirve como control. ② Las dos muestras se incuban brevemente con una baja concentración de DNasa I- condiciones que aseguran que la mayor parte de las moléculas de DNA se procesarán una sola vez. Las flechas indican lugares posibles de procesamiento en el DNA. ③ Las dos mezclas de incubación se someten a electroforesis y se visualizan por autorradiografía. El carril control (a la derecha) tiene nueve bandas porque se han cortado todos los posibles lugares de procesamiento. Sin embargo, el otro carril (a la izquierda) ha perdido algunas de las bandas porque la proteína que se unió al DNA protegió algunas zonas durante el tratamiento con DNasa. El espacio vacío de este carril es la «huella» que identifica la localización y la longitud de la secuencia de DNA que está en contacto con la proteína de unión a DNA.

Una aproximación más reciente, denominada *ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)* se utiliza mucho para estudiar sitios de unión a DNA en la cromatina de células eucariotas. En el ensayo ChIP, las células se tratan primero con formaldehído para generar interacciones estables entre las proteínas y los sitios del DNA a los que se unen normalmente. Después, se perturban las células para cortar la cromatina en pequeños fragmentos y los fragmentos de cromatina se tratan con un anticuerpo dirigido contra la proteína de interés. Los fragmentos de DNA unidos a la proteína precipitarán con el anticuerpo y se puede analizar la secuencia del DNA precipitado.

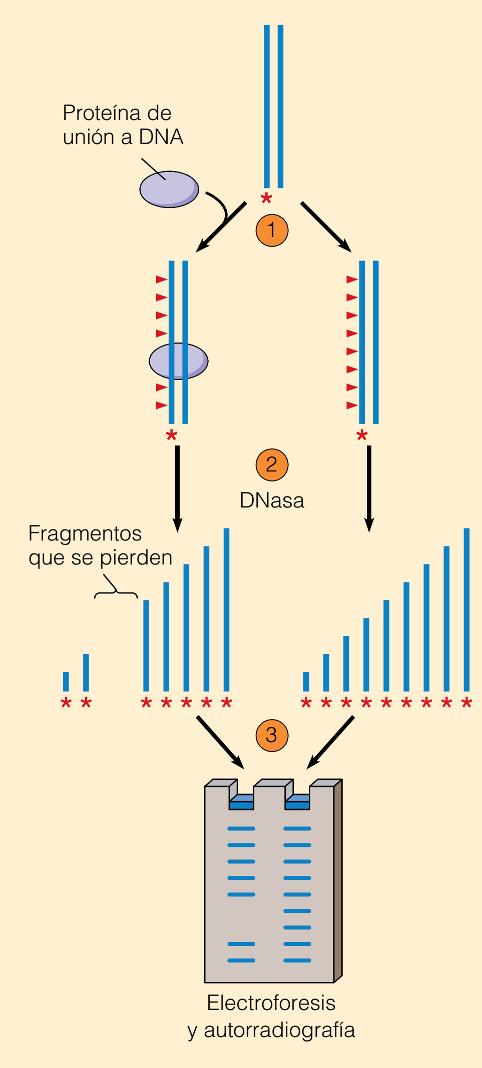


Figura 21B.1 **Huella de DNA por DNasa como herramienta para identificar sitios del DNA que se unen a proteínas específicas.**

sarios para el procesamiento de la lactosa en el mismo organismo es TATGTT, y la secuencia dada en la Figura 21.10 es TATAAT. Las secuencias promotoras que se muestran en la figura son **secuencias consenso**, que están constituidas por los nucleótidos mayoritarios en cada posición para cada secuencia. Las mutaciones que causan desviaciones significativas respecto a la secuencia consenso tienden a interferir con la función promotora y pueden incluso llegar a eliminarla por completo.

Iniciación de la síntesis de RNA. Una vez que una molécula de RNA polimerasa se ha unido a un promotor y ha desenrollado localmente una doble hélice de DNA, tiene lugar la *iniciación* de la síntesis de RNA. Uno de los dos segmentos expuestos del DNA de cadena sencilla sirve como molde para la síntesis de RNA, usando como sustrato ribonucleótidos trifosfato (NTPs). La hebra de DNA que lleva el promotor determina cómo se orienta la RNA polimerasa, y la orientación de la enzima, a su vez, determina qué hebra de

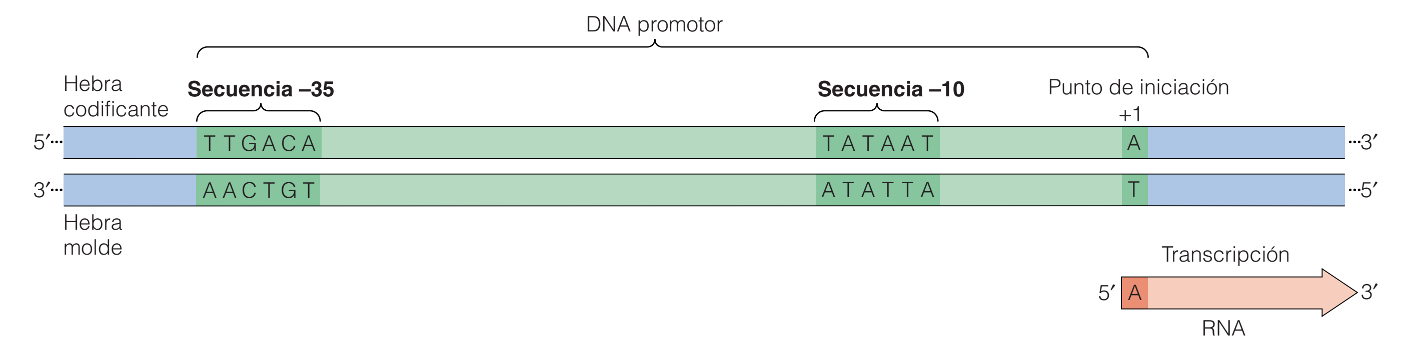


Figura 21.10 Un típico promotor procariota. La secuencia promotora en procariotas es un segmento de alrededor de 40 pb adyacentes al punto de iniciación de la transcripción. Por convención, las secuencias críticas se dan tal y como aparecen en la hebra codificante (la contraria a la hebra molde, que es la que se corresponde con la secuencia del RNA transcrito). Los componentes esenciales del promotor son el punto de inicio (designado +1, es normalmente una A), la secuencia de seis nucleótidos −10 y la secuencia de seis nucleótidos −35. Como sus nombres indican, las dos secuencias clave están localizadas aproximadamente a 10 y 35 nucleótidos corriente arriba del punto de inicio. Las secuencias que se muestran aquí son secuencias consenso, lo que significa que tienen en cada posición la base más comúnmente encontrada. Para la función del promotor son importantes el número de nucleótidos que separan las secuencias consenso entre sí y del punto de iniciación, pero no la identidad de estas secuencias.

DNA se transcribirá (*véase* Figura 21.9). Tan pronto como los dos primeros NTPs se unen mediante puentes de hidrógeno a las bases complementarias de la hebra de DNA molde en el punto de inicio, la RNA polimerasa cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre el grupo 3′-hidroxilo del primer NTP y el grupo 5′-fosfato del segundo, liberándose un grupo pirofosfato (PP_i). La polimerasa avanza entonces a lo largo del promotor a medida que van añadiéndose nucleótidos adicionales uno a uno, el grupo 5′-fosfato de cada nucleótido nuevo se une al grupo 3′-hidroxilo de la cadena de RNA en formación, hasta que la cadena tiene alrededor de nueve nucleótidos de longitud. En este punto, el factor sigma generalmente se separa de la molécula de RNA polimerasa y queda completado el paso de iniciación.

Elongación de la cadena RNA. La *elongación* de la cadena (Figura 21.11) continúa cuando la RNA polimerasa se mueve a lo largo de la molécula de DNA, desenrollando la hélice poco a poco y añadiendo un nucleótido complementario de manera que la cadena de RNA va creciendo. La enzima se mueve a lo largo de la hebra molde desde 3′ hacia el extremo 5′. Dado que el apareamiento entre bases complementarias de la hebra de DNA molde y la de RNA en formación es antiparalelo, la hebra de RNA se alarga en la dirección 5′ ⟶ 3′ a medida que se añaden nucleótidos al

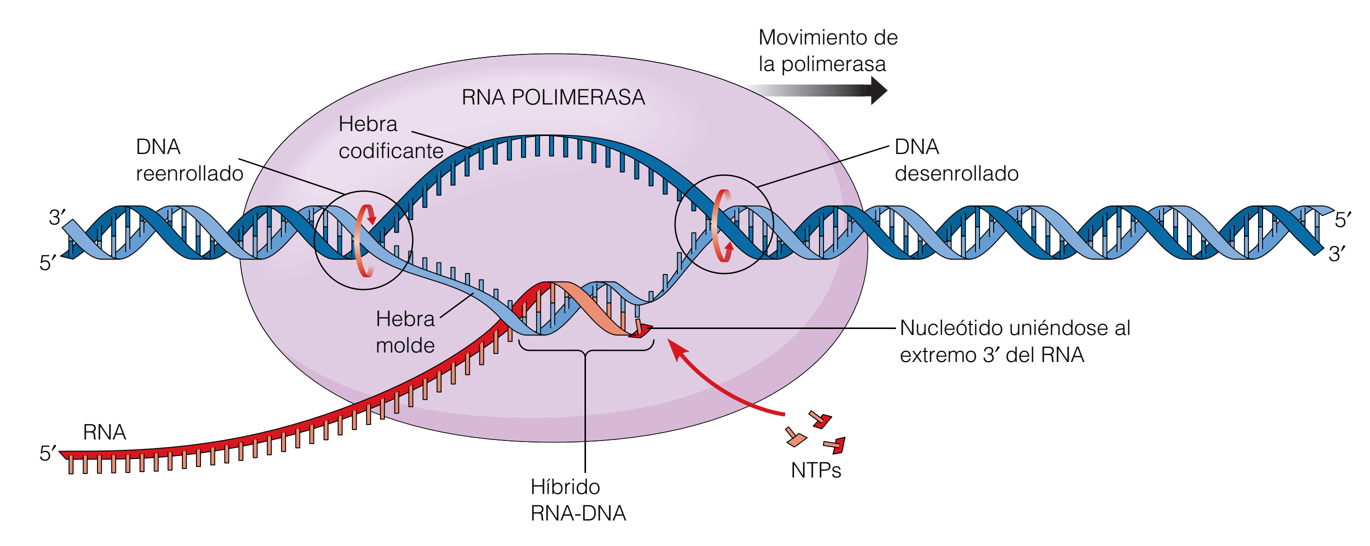


Figura 21.11 Una aproximación al complejo de elongación procariota. Durante la elongación, la RNA polimerasa se une a unas 30 pb del DNA. (Recuerde que cada vuelta completa de la doble hélice de DNA tiene unos 10 pb.) En algún momento, se produce el desenrollamiento de unos 18 pb, y el RNA sintetizado más recientemente todavía está unido mediante puentes de hidrógeno al DNA, formando un pequeño híbrido RNA-DNA de unos 8-9 pb. La longitud total del RNA en formación unido a la enzima y/o el DNA es de unos 25 nucleótidos. Esta representación está aproximadamente a escala.

extremo 3′ de la cadena que se está formando. (Es la misma dirección de síntesis del DNA durante la replicación.) A medida que va creciendo la cadena de RNA, los últimos nucleótidos añadidos permanecen apareados con el DNA molde, formando un híbrido RNA-DNA corto, de unos 8-9 pb. A medida que la polimerasa se mueve, el DNA que queda corriente abajo de la enzima se desenrolla para permitir la formación del híbrido RNA-DNA y el DNA que queda corriente arriba de la enzima se vuelve a enrollar formando de nuevo la doble hélice. Las polimerasas evitan el superenrollamiento que se generaría por estos procesos de enrollamiento y desenrrollamiento, de la misma forma que sucede en el proceso de replicación del DNA.

Igual que la DNA polimerasa, algunas RNA polimerasas tienen actividad 3′ ⟶ 5′exonucleasa, que les permite corregir errores eliminando nucleótidos apareados incorrectamente del extremo 3′ de la hebra de RNA en formación inmediatamente después de la incorporación de la base incorrecta. El resultado es un mecanismo de *corrección de RNA*, para corregir errores transcripcionales, que es análogo al mecanismo de corrección de la replicación del DNA, descrito en el Capítulo 19. Los errores ocasionales en la síntesis del RNA no son tan críticos como los errores en la replicación del DNA porque se trancriben muchas copias de RNA de cada gen y por lo tanto sólo existirán unas pocas copias de la versión incorrecta. Sin embargo, sólo se replica una copia de cada molécula de DNA antes de la división. Ya que cada célula recibe un conjunto de moléculas de DNA, es crucial que el mecanismo de copia utilizado durante la replicación del DNA sea extremadamente preciso.

Terminación de la síntesis de RNA. La elongación de la hebra de RNA se sigue produciendo hasta que la RNA polimerasa copia una secuencia especial, denominada **señal de terminación**, que determina el final de la transcripción. En las bacterias se pueden distinguir dos tipos de señales de terminación que difieren en el requerimiento o no de la participación de una proteína denominada **factor rho** (ρ)**.** Las moléculas de RNA que terminan sin la participación del factor rho contienen una secuencia corta rica en GC seguida de varios residuos U cerca del extremo 3′ (Figura 21.12). Ya que los pares GC se mantienen unidos mediante tres puentes de hidrógeno y los pares AU están unidos sólo por dos puentes de hidrógeno, esta configuración promueve la terminación de la siguiente forma: primero, la región GC contiene secuencias complementarias entre sí lo que genera un plegamiento espontáneo del RNA, formándose una horquilla que tiende a liberar el RNA del DNA. Después se rompen los puentes más débiles entre los residuos U de la secuencia de RNA y la secuencia de DNA, liberando la molécula de RNA sintetizada.

Por el contrario, las moléculas de RNA que requieren la participación del factor rho para la terminación no forman una horquilla rica en GC. Los genes que codifican

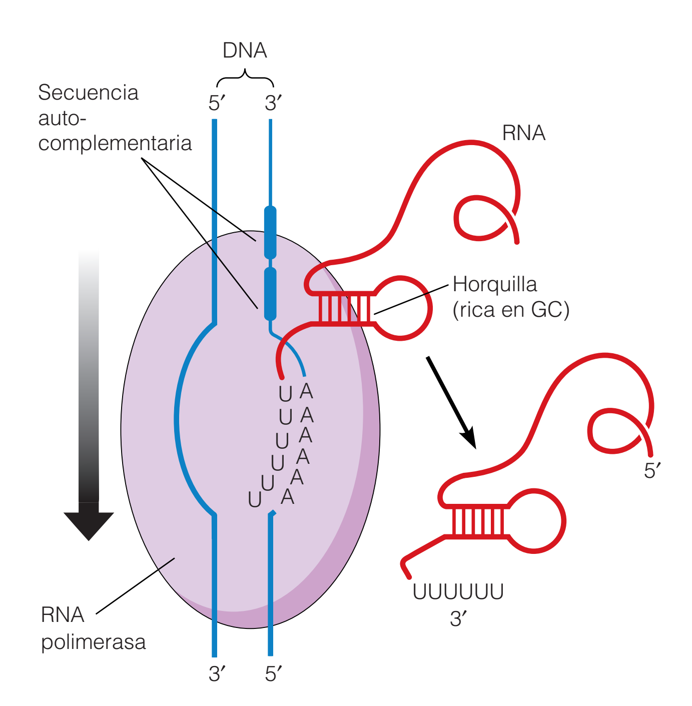


Figura 21.12 La terminación de la transcripción en los genes procariotas que no requieren el factor de terminación rho. Una secuencia corta auto-complementaria cercana al final del gen permite que la nueva hebra de RNA forme una estructura de horquilla que facilita la disociación del RNA del DNA molde.

este tipo de RNAs se descubrieron por primera vez en experimentos en los que se transcribió DNA purificado del fago λ con RNA polimerasa purificada. Se encontró que algunos genes se transcribían en moléculas de RNA que eran más largas que los RNAs producidos en células vivas, lo que sugería que la transcripción no se producía adecuadamente. Este problema se resolvió añadiendo el factor rho, que se une a secuencias de terminación específicas de entre 50-90 bases localizadas cerca del extremo 3′ de las moléculas de RNA en formación. El factor rho actúa como una enzima dependiente de ATP que desenrolla el híbrido DNA-RNA, moviéndose a lo largo de la nueva molécula de RNA hacia su extremo 3′ y desenrollándola del molde de DNA.

Si la terminación es rho-dependiente o depende de la formación de una horquilla, se produce la liberación de la molécula de RNA completa y del núcleo de la RNA polimerasa. El núcleo de la polimerasa puede entonces unirse al factor sigma de nuevo y reiniciar la síntesis de RNA en otro promotor.

Transcripción en las células eucariotas

La transcripción en las células eucariotas presenta los cuatro estados descritos en la Figura 21.9, pero el proceso en las células eucariotas es más complicado que en procariotas. Las principales diferencias son las siguientes:

- Son *tres RNA polimerasas distintas* las que transcriben el DNA en eucariotas. Cada una sintetiza una o más clases de RNA.
- Los promotores eucariotas son más variados que los promotores procariotas. No sólo se trata de que las RNA polimerasas utilicen distinto tipo de promotores sino que hay una gran variación dentro de cada tipo, especialmente entre los de los genes que codifican proteínas. Es más, algunos promotores eucariotas están de hecho localizados *corriente abajo* del punto de iniciación de la transcripción.
- La unión de las RNA polimerasas eucariotas al DNA requiere la participación de proteínas adicionales, denominadas factores de transcripción. A diferencia del factor sigma bacteriano, los factores de transcripción eucariotas no forman parte de la molécula de RNA polimerasa, sino que algunos de ellos se deben unir al DNA antes de que la RNA polimerasa se una al promotor e inicie la transcripción. Así, son principalmente los factores de transcripción, mas que la propia RNA polimerasa, los que determinan la especificidad de la transcripción en eucariotas. En este capítulo, nos centraremos en el tipo de factores de transcripción que son esenciales para la transcripción de todos los genes transcritos por una RNA polimerasa. En el Capítulo 23 explicaremos los factores de transcripción de tipo regulatorio, que actúan selectivamente sobre genes específicos.
- Las interacciones proteína-proteína son muy importantes en el primer paso de la transcripción en eucariotas. Aunque algunos factores de transcripción se unen directamente al DNA, muchos se unen a otras proteínas, tanto a otros factores de transcripción como a la propia RNA polimerasa.
- La disociación del RNA es más importante que el lugar donde termina la transcripción para determinar la localización del extremo 3′ en el RNA producido.
- Las moléculas de RNA eucariota recién formadas normalmente experimentan un importante *procesamiento* (modificación química) durante y especialmente después de la transcripción.

Examinaremos varios aspectos de la transcripción en eucariotas, empezando por la existencia de múltiples formas de la RNA polimerasa.

Las RNA polimerasas I, II y III llevan a cabo la transcripción en el núcleo de las células eucariotas

La Tabla 21.1 resume algunas propiedades de las tres RNA polimerasas que funcionan en el núcleo de la célula eucariota, así como otras dos localizadas en las mitocondrias y cloroplastos. Las enzimas nucleares se denominan RNA polimerasas I, II y III. Como se indica en la tabla, estas enzimas difieren en su localización dentro del núcleo y en el tipo de RNA que sintetizan. Las RNA polimerasas nucleares también se diferencian en su sensibilidad a varios inhibidores, como la *α-amanitina*, una toxina mortal producida por el hongo *Amanita phalloides* (conocida normalmente como «el sombrero de la muerte» o «el ángel destructor»).

La RNA polimerasa I se encuentra en el nucleolo y es la responsable de la síntesis de una molécula de RNA que sirve como precursor de tres de los cuatro tipos de rRNA encontrados en los ribosomas eucariotas (rRNA 28S, rRNA 18S y rRNA 5.8S). Esta enzima no es sensible a α-amanitina. Su asociación con el nucleolo es comprensible ya que el nucleolo es el lugar donde tiene lugar la síntesis y el ensamblaje de los ribosomas.

La RNA polimerasa II se encuentra en el nucleoplasma y sintetiza precusores del mRNA, la molécula de RNA que codifica proteínas. Además, la RNA polimerasa II sintetiza la mayoría de los RNAsn (RNA pequeños nucleolares), implicado en el procesamiento postranscripcional. Así, la RNA polimerasa II es la responsable de la síntesis de la mayor variedad de moléculas de RNA. Esta enzima es extremadamente sensible a α-amanitina, lo que explica la toxicidad de este compuesto para los humanos y otros animales.

La RNA polimerasa III también es una enzima nucleoplásmica, pero sintetiza distintos tipos de pequeños RNAs, incluyendo precursores del tRNA y los tipos de RNA ribosomal más pequeños, los rRNA 5S. La RNA polimerasa III es sensible a α-amanitina, pero sólo a niveles mayores de los requeridos para inhibir a la RNA polimerasa II. (Las enzimas equivalentes en algunos otros eucariotas, como los insectos y las levaduras, son insensibles a α-amanitina.)

Las RNA polimerasas I, II y III son estructuralmente bastante similares entre sí, así como al núcleo de la RNA

Tabla 21.1 Propiedades de las RNA polimerasas eucariotas

RNA polimerasa	Localización	Productos principales	Sensibilidad a α-amanitina
I	Nucleolo	Precursor de los rRNA 28S, 18S y 5,8S	Resistente
II	Nucleoplasma	Pre-mRNA y la mayoría de los RNAsn	Muy sensible
III	Nucleoplasma	Pre-tRNA, rRNA 5S y otros pequeños RNAs	Moderadamente sensible*
Mitocondrial	Mitocondria	RNA mitocondrial	Resistente
Cloroplasto	Cloroplasto	RNA de los cloroplastos	Resistente

* En mamíferos.

polimerasa procariota. Las tres enzimas son bastante grandes, con múltiples unidades polipeptídicas y pesos moleculares de alrededor de 500.000. La RNA polimerasa II, por ejemplo, tiene más de diez subunidades de, al menos, ocho tipos distintos. Las tres subunidades mayores están relacionadas evolutivamente con las subunidades α, β y β' de la RNA polimerasa procariota. Las tres subunidades más pequeñas no están relacionadas pero también se encuentran en las RNA polimerasas II y III. Las RNA polimerasas de las mitocondrias y los cloroplastos son muy similares a sus equivalentes procariotas, como se esperaría del probable origen de estos orgánulos como bacterias endosimbiontes (*véase* Anexo 11A). Como las RNA polimerasas procariotas, son resistentes a α-amanitina.

En los genes nucleares eucariotas se encuentran tres tipos de promotores, uno para cada tipo de RNA polimerasa

Los promotores a los que se unen las RNA polimerasas eucariotas son incluso más variados que los promotores procariotas, pero se pueden agrupar en tres categorías principales, una para cada tipo de polimerasa. La Figura 21.13 muestra las características de los tres tipos de promotores.

El promotor que utiliza la RNA polimerasa I, es decir, el promotor de la unidad transcripcional que produce el precusor de los tres rRNA más grandes tiene dos partes (Figura 21.13a). La parte denominada **núcleo del promotor** —definido como la secuencia mínima necesaria para controlar exactamente la iniciación de la transcripción por la RNA polimerasa— se prolonga hasta la secuencia de nucleótidos que se va a transcribir. Es suficiente para que se dé una iniciación de la transcripción adecuada, pero la transcripción tiene lugar de forma más eficiente si está presente un elemento de *control corriente arriba*, que tiene una longitud bastante similar (aunque no igual) a la del núcleo del promotor. El anclaje de los factores de transcripción a ambas partes del promotor facilita la unión de la RNA polimerasa I al núcleo del promotor, permitiéndole iniciar la transcripción en el punto de iniciación.

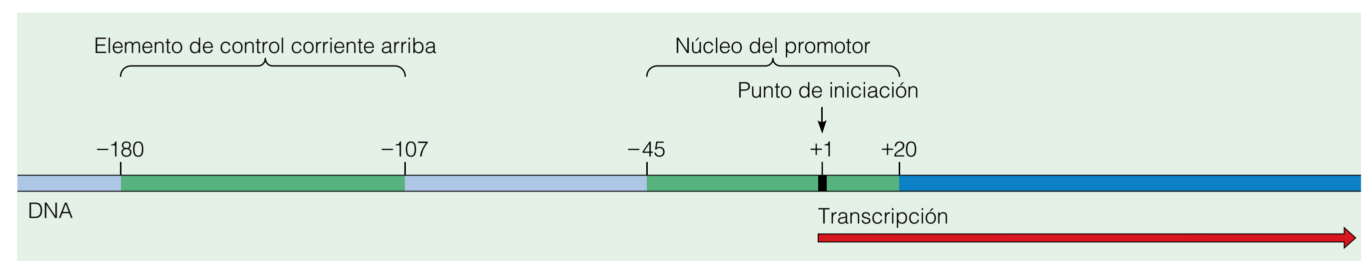
En el caso de la RNA polimerasa II, hay al menos cuatro tipos de secuencias implicadas en la función del núcleo del promotor (Figura 21.13b). Estos cuatro elementos son (1) una secuencia corta de **iniciación (Inr)** rodeando el punto de iniciación de la transcripción (que suele ser una A en procariotas); (2) la caja TATA, que consiste en una secuencia consenso TATA seguida de dos o tres A más, localizadas normalmente a unos 25 nucleótidos corriente arriba del punto de iniciación; (3) el **elemento de reconocimiento TFIIB (BRE)** localizado inmediatamente corriente arriba de la caja TATA; y (4) el elemento promotor corriente abajo (DPE), localizado unos 30 nucleótidos corriente abajo del punto de iniciación. Estos cuatro elementos están organizados en dos tipos generales de núcleos del promotor: los *promotores dirigidos por TATA*, que contienen una secuencia Inr y una caja TATA asociada o no a BRE y los *promotores dirigidos por DPE*, que contienen secuencias DPE e Inr pero no caja TATA o BRE.

Cualquiera de estos tipos de promotor es, por sí mismo, capaz de sostener un nivel de transcripción *basal* (bajo). Sin embargo, la mayoría de los genes que codifican proteínas tienen secuencias cortas adicionales corriente arriba —elementos de control corriente arriba— que mejoran la eficiencia del promotor. Algunos de estos elementos corriente arriba son comunes a muchos genes distintos; algunos ejemplos son la *caja CAAT* (con secuencia consenso GCCCAATCT en animales y levaduras) y la *caja GC* (con secuencia consenso GGGCGG). Las localizaciones de estos elementos respecto a los sitios de iniciación de los genes varían de un gen a otro. Los elementos dentro de los 100-200 nucleótidos del punto de iniciación se suelen denominar *elementos de control proximal*, para distinguirlos de los **elementos potenciadores** que tienden a localizarse más lejos, pudiendo incluso encontrarse corriente abajo del gen. Volveremos a tratar los elementos de control proximal y los potenciadores en el Capítulo 23.

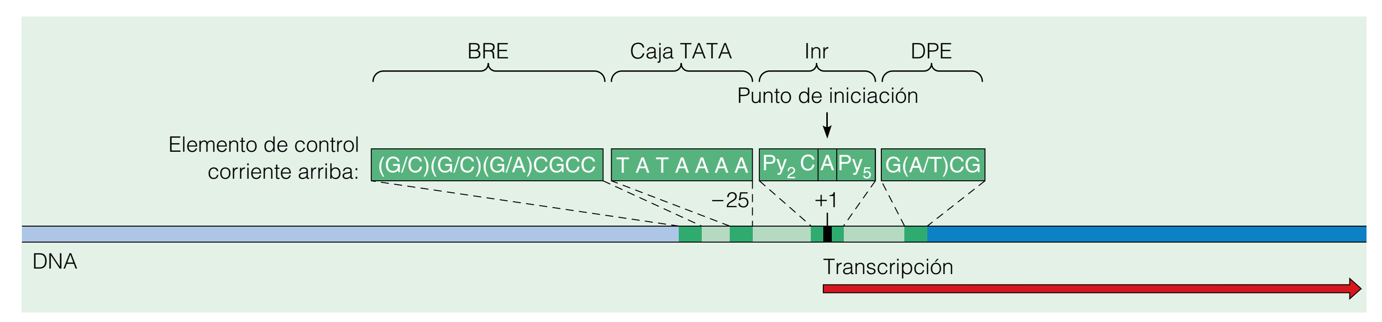
Las secuencias importantes para la actividad del promotor suelen identificarse delecionando secuencias específicas de una molécula de DNA clonada, para la que después se comprueba si presenta la capacidad de servir como molde para la transcripción génica, bien en un tubo de ensayo o bien tras la introducción de este DNA en células en cultivo. Por ejemplo, cuando se analiza de esta forma la transcripción del gen de la β-globina (la cadena β de la hemoglobina), la deleción de la caja TATA o de la caja CAAT corriente arriba reduce la tasa de transcripción al menos 10 veces.

A diferencia de las RNA polimerasas I y II, la RNA polimerasa III usa promotores que se encuentran enteramente *corriente abajo* del punto de iniciación de la transcripción cuando transcriben los genes tRNA y rRNA 5S. Los promotores utilizados por los genes tRNA y rRNA 5S son distintos pero en ambos casos, las secuencias consenso se encuentran en dos bloques de unos 10 pb (Figura 21.13c). El promotor tRNA tiene secuencias consenso denominadas *caja A* y *caja B*. Los promotores de rRNA 5S tienen una caja A (posicionada más lejos del punto de iniciación que los promotores en los genes tRNA) y otra secuencia crítica, denominada *caja C* (no se muestra en la figura. Se trata de un tercer tipo de promotor de la RNA polimerasa III, localizado corriente arriba y que se utiliza para la síntesis de otros tipos de pequeñas moléculas de RNA).

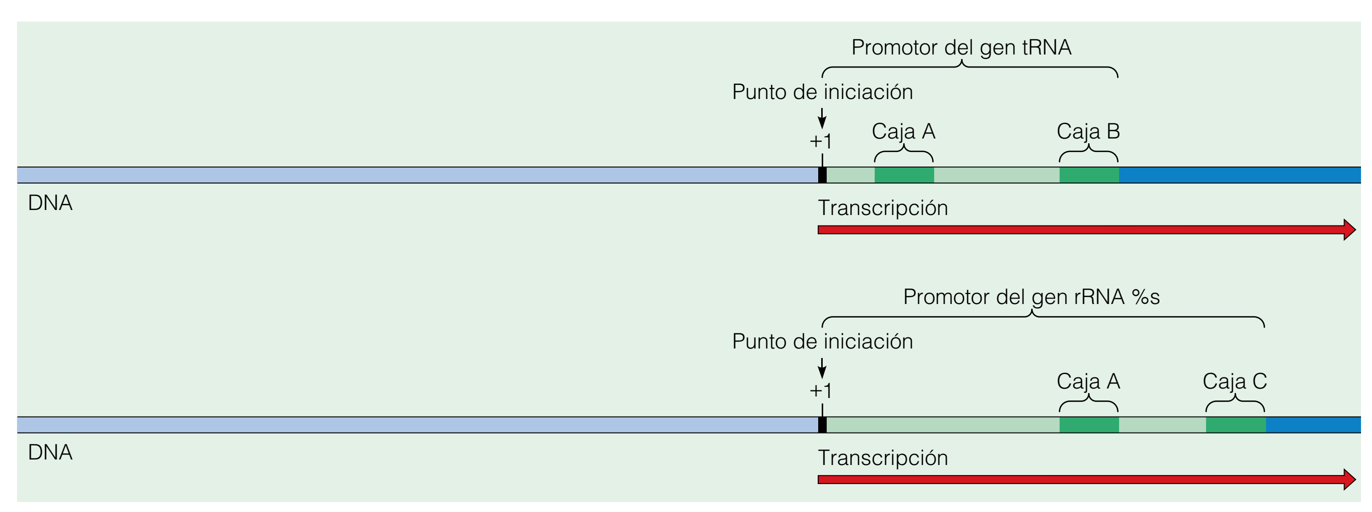
Los promotores usados por todas RNA polimerasas eucariotas deben ser reconocidos por factores de transcripción antes de que la molécula de RNA polimerasa pueda unirse al DNA. Volvemos en este punto a los factores de transcripción.



(a) Promotor de la RNA polimerasa I



(b) Elementos del núcleo del promotor de la RNA polimerasa II



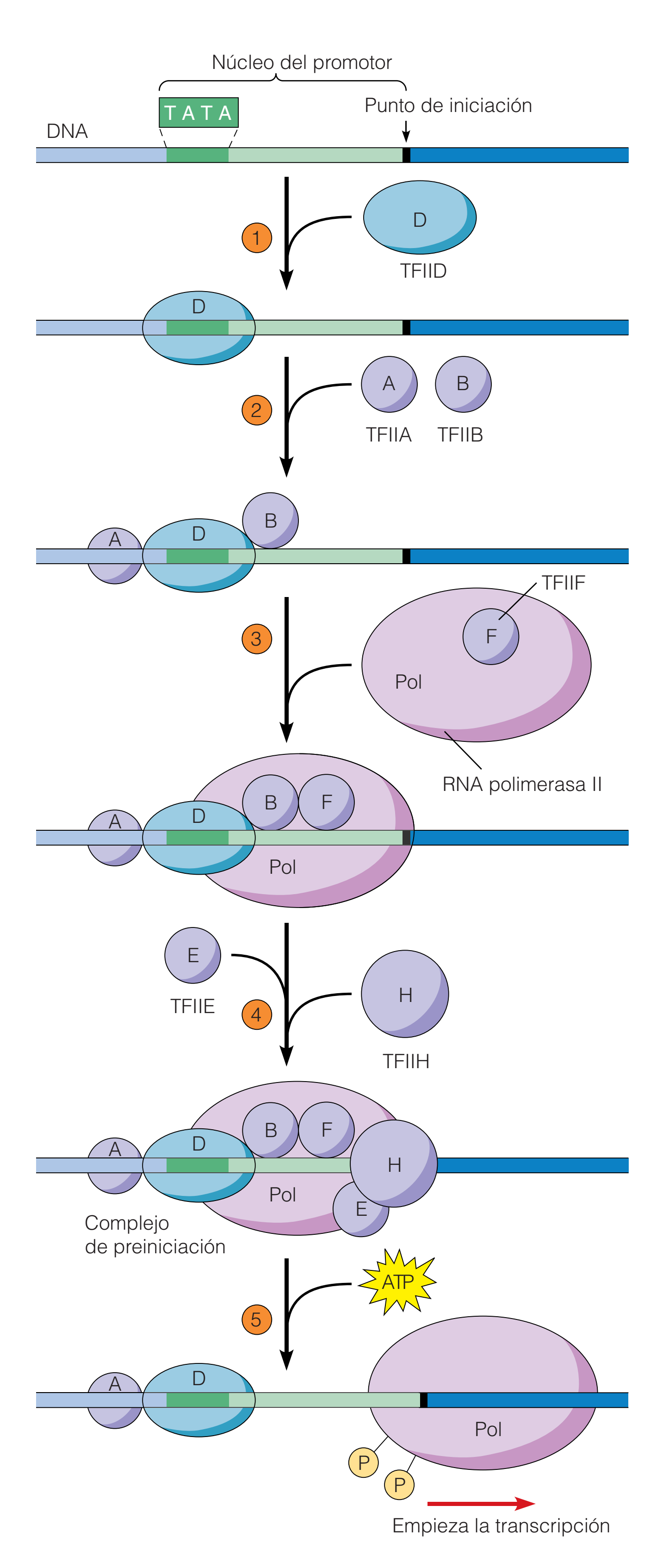
(c) Dos tipos de promotores de la RNA polimerasa III

Figura 21.13 Promotores eucariotas utilizados más comúnmente por las RNA polimerasas I, II y III. (**a**) El promotor de la RNA polimerasa I tiene dos partes, un núcleo rodeando el punto de iniciación y un elemento de control corriente arriba. Después de la unión de los factores de transcripción adecuados a ambas partes, la RNA polimerasa se une al núcleo del promotor. (**b**) El promotor tipo de la RNA polimerasa II tiene una secuencia corta de iniciación (Inr), que consta fundamentalmente de pirimidinas (Py) combinadas con una caja TATA o un elemento promotor corriente abajo (DPE). Los promotores que contienen la caja TATA también pueden incluir un elemento de reconocimiento TFIIB (BRE) como parte del núcleo del promotor. (**c**) Los promotores de la RNA polimerasa III presentan estructuras variables pero los de los genes tRNA y rRNA 5S se localizan por completo corriente abajo del punto de iniciación, dentro de la secuencia transcrita. Las cajas A, B y C son secuencias consenso, de alrededor de 10 pb. En los genes tRNA, entre 30-60 pb de DNA separan las cajas A y B; en los genes rRNA 5S, entre 10-30 pb separan las cajas A y C.

Los factores de transcripción generales están implicados en la transcripción de todos los genes nucleares

Vamos a centrarnos ahora en el importante papel de los factores de transcripción en los eucariotas, utilizando como ejemplo la RNA polimerasa II. Un factor de **transcripción general** es una proteína que es siempre necesaria para que la molécula de RNA polimerasa se una a su promotor e inicie la síntesis de RNA, independientemente de la identidad de la secuencia del gen específico implicado. Los eucariotas tienen varios factores de transcripción; sus nombres suelen incluir «TF» (de factor de transcripción), un número romano que identifica a la polimerasa a la que asisten y una letra mayúscula que identifica individualmente cada factor (por ejemplo, TFIIA, TFIIB y así hasta el cuarto).

La Figura 21.14 ilustra la participación de los factores de transcripción generales en la unión de la RNA polimerasa II a un promotor que contiene la secuencia TATA en el DNA. Los factores de transcripción generales se unen a los promotores en un orden definido, empezando por TFIID. Mientras TFIID se une directamente a la secuencia de DNA (la caja TATA en este ejemplo o la secuencia DPE en el caso de los promotores dirigidos por DPE), los otros factores de transcripción interaccionan antes entre sí. Por lo tanto, las interacciones proteína-proteína tienen un importante papel en el paso de unión de la transcripción en eucariotas. La RNA polimerasa II no se une al DNA hasta varios pasos más adelante. Finalmente, un gran complejo proteico, que incluye a la RNA polimerasa, se une a la región promotora para formar el *complejo de preiniciación*.



De hecho, antes de que la RNA polimerasa II pueda iniciar la síntesis de RNA, debe liberarse del complejo de preiniciación. El factor de transcripción TFIIH tiene un papel clave en este proceso, porque posee actividad helicasa que desenrolla el DNA y actividad proteína kinasa que cataliza la fosforilacion de la RNA polimerasa II. La fosforilación cambia la forma de la RNA polimerasa, liberándola así de los factores de transcripción, de manera que pueda iniciar la síntesis de RNA en el punto de iniciación. Al mismo tiempo, se cree que la actividad helicasa de TFIIH desenrolla el DNA de forma que la RNA polimerasa pueda empezar a moverse.

TFIID, el factor inicial de unión al promotor, merece una mención especial. Su capacidad de reconocer y unirse a secuencias promotoras de DNA viene dada por una de sus subunidades, la **proteína de unión a TATA (TBP)**, que se combina con un número variable de subunidades proteicas adicionales para dar lugar al TFIID. A pesar de su nombre, la capacidad de TBP de unirse a DNA, mostrada en la Figura 21.15, no se limita a los promotores que contienen la secuencia TATA. TBP también se puede unir a promotores que carecen de caja TATA, incluyendo a los promotores usados por las RNA polimerasas I y II. Dependiendo del tipo de promotor, TBP se asocia con distintas proteínas y en los promotores que carecen de caja TATA, la mayor parte de la especificidad deriva probablemente de su interacción con estas proteínas asociadas.

Figura 21.14 El papel de los factores de transcripción generales en la unión de la RNA polimerasa II al DNA. La figura resume la unión secuencial de seis factores de transcripción generales (denominados TFII_, donde _ es una letra que identifica el factor en concreto) y la polimerasa. ① TFIID se une a la caja TATA del DNA, seguida por ② la unión de TFIIA y TFIIB. ③ El complejo resultante se une ahora a la polimerasa, a la que ya se ha unido el factor TFIIF. ④ El complejo de preiniciación se completa con la adición de TFIIE Y TFIIH. ⑤ Después de un paso de activación que requiere fosforilación de la RNA polimerasa, dependiente de ATP, a polimerasa puede iniciar la transcripción. En la cromatina intacta, la unión eficiente entre los factores de transcripción, la RNA polimerasa y el DNA requiere la participación de proteínas reguladoras adicionales que abren la estructura de la cromatina y facilitan el ensamblaje del complejo de preiniciación en genes específicos (*véase* Figura 23.23).

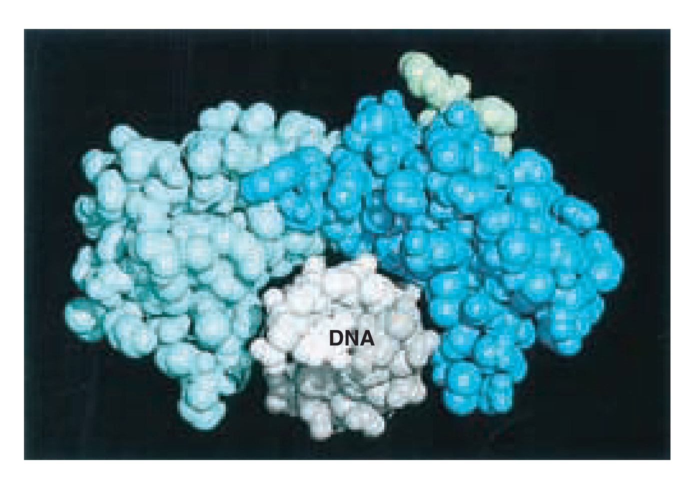


Figura 21.15 Proteína de unión a TATA (TBP) unida al DNA. En este modelo gráfico, se muestra TBP unida a DNA (blanco y gris, con una orientación de forma que su eje mira hacia abajo). TBP difiere de la mayoría de las proteínas de unión a DNA ya que interacciona con el surco menor del DNA, en lugar de con el surco mayor, provocando una acusada curvatura en el DNA. La molécula de TBP que se muestra aquí pertenece a la planta *Arabidopsis thaliana*, pero la TBP ha sido conservada altamente durante la evolución. El azul claro y oscuro diferencian los dos dominios simétricos del polipéptido; el verde indica el segmento N-terminal, no conservado. Cuando TBP se une a DNA, otros factores de transcripción pueden interaccionar con la superficie convexa de la «silla» de TBP. TBP está implicada en el proceso de iniciación de la transcripción de todos los tipos de promotores eucariotas.

Además de los factores de transcripción generales y de la RNA polimerasa II, se requieren otro tipo de proteínas para la transcripción eficiente de la cromatina y para la activación regulada de determinados genes. Algunas de estas proteínas están implicadas en la apertura de la estructura de la cromatina para facilitar la unión de la RNA polimerasa. Otras son los *factores de transcripción reguladores*, que activan genes específicos mediante la unión de elementos de control corriente arriba y el reclutamiento de *proteínas coactivadoras* que a su vez facilitan el ensamblaje del complejo de preiniciación de la RNA polimerasa. En el Capítulo 23, que trata la regulación de la expresión génica, describiremos la identidad y las funciones de estas proteínas reguladoras (*véase* Figura 23.23).

La elongación, terminación y la liberación del RNA completan la síntesis del RNA

Después de iniciar la transcripción, la RNA polimerasa se mueve a lo largo del DNA y sintetiza una copia de RNA de la hebra molde de DNA. Unas proteínas especiales facilitan el desensamblaje de los nucleosomas frente a la polimerasa en movimiento y su reensamblaje después del paso de la enzima. Si encuentra un defecto en el DNA, la RNA polimerasa puede paralizarse temporalmente mientras el DNA es reparado por proteínas que llevan a cabo reparación por escisión.

La terminación de la transcripción está dirigida por varias señales que varían en función de la enzima implicada. Por ejemplo, en la transcripción llevada a cabo por la RNA polimerasa I, la terminación está dirigida por un factor proteico que reconoce una señal de terminación de 18 nucleótidos en la cadena de RNA en formación. También se conocen las señales de terminación para la RNA polimerasa III; las señales siempre incluyen un segmento corto de U (como en las señales de terminación en procariotas) y no son necesarios factores proteicos complementarios. Las estructuras en forma de horquilla no parecen estar implicadas en la terminación de la transcripción llevada a cabo por las polimerasas I y III.

En el caso de la RNA polimerasa II, la mayoría de los transcritos de mRNA son procesados en un lugar específico antes de que termine la transcripción. El sitio de procesamiento se encuentra 10-35 nucleótidos corriente abajo de una secuencia especial AAUAAA de la cadena en formación. La polimerasa puede continuar la transcripción durante cientos o incluso miles de nucleótidos más allá del sitio de procesamiento, pero este RNA adicional se degrada rápidamente. El sitio de procesamiento es también el lugar donde se adiciona la *cola de poli(A)*, un conjunto de nucleótidos de adenina que se encuentran en el extremo 3′de la mayoría de los mRNA eucariotas. La adición de la cola de poli(A) es parte del procesamiento del RNA, nuestro próximo tema.

Procesamiento del RNA

Una molécula recién producida por transcripción, denominada **tránscrito primario**, suele experimentar cambios químicos antes de poder desempeñar su función en la célula. Utilizamos el término **procesamiento del RNA** para referirnos a todas las modificaciones químicas necesarias para generar un RNA final, producto del tránscrito primario que funciona como precursor. El procesamiento suele implicar la eliminación de partes del tránscrito primario y puede suponer también la adición de modificaciones químicas de nucleótidos específicos. Por ejemplo, la metilación de las bases de ribosa es una modificación bastante común en determinados nucleótidos. Además de las modificaciones químicas, suelen ser necesarios otros procesos postrancripcionales antes de que el RNA sea funcional, como la asociación con proteínas específicas o (en eucariotas) el transporte desde núcleo al citoplasma.

En esta sección, vemos la importancia de los pasos de procesamiento implicados en la producción de rRNA, tRNA y mRNA a partir de sus respectivos tránscritos primarios. Aunque el término procesamiento del RNA suele asociarse a sistemas eucariotas, los procariotas procesan también parte de su RNA. Así, incluiremos ejemplos de RNAs procariotas y eucariotas.

El procesamiento del RNA ribosomal implica la ruptura de un precusor común en múltiples tRNA

El RNA ribosomal (rRNA) es, con diferencia, la forma más estable y abundante de RNA encontrada en las células. Normalmente, el rRNA representa entre el 70 y el 80% del RNA celular total, el tRNA un 10-20% y el mRNA menos del 10%. En eucariotas, los ribosomas citoplasmáticos tienen cuatro tipos de rRNA, que suelen identificarse por su distinta velocidad de sedimentación durante la centrifugación. La Tabla 21.2 enumera los coeficientes de sedimentación (valores de S) de distintos tipos de rRNA. La más pequeña de las dos unidades ribosomales tiene una sola molécula de rRNA 18S; la subunidad más grande contiene tres moléculas de rRNA, una de alrededor de 28S (puede ser 25 S en algunas especies) y otras dos de aproximadamente 5,8S y 5S. En los ribosomas procariotas, sólo se encuentran tres tipos de rRNA: una molécula 16S asociada a la subunidad menor y dos moléculas 23S y 5S asociadas a la subunidad mayor.

De los cuatro tipos de rRNA que se encuentran en los ribosomas eucariotas, los tres más grandes (28S, 18S y 5,8S) están codificados por una sola unidad transcripcional que es transcrita por la RNA polimerasa I en el nucleolo para dar lugar un tránscrito primario denominado **pre-rRNA** (Figura 21.16c). Las secuencias de DNA que codifican estos tres rRNA están separadas dentro de la unidad transcripcional por segmentos de DNA denominados *espaciadores transcritos.* La presencia de tres genes rRNA distintos dentro de una misma unidad transcripcional asegura que la célula producirá estos tres rRNA en la misma cantidad. La mayoría de los genomas eucariotas tiene múltiples copias de la unidad transcripcional pre-rRNA colocadas unas detrás de otras (tandem) (Figura 21.16a), lo que facilita la producción de las grandes cantidades de RNA ribosomal que normalmente necesitan las células. El genoma humano haploide, por ejemplo, tiene 150-200 copias de la unidad pretranscripcional pre-rRNA distribuidas por cinco cromosomas. Los espaciadores no transcritos separan las unidades transcripcionales dentro de cada conjunto.

Después de que la RNA polimerasa I ha transcrito la unidad pretranscripcional, la molécula de pre-rRNA resultante es procesada por una serie de reacciones de corte que eliminan los espaciadores transcritos y liberan los rRNA maduros (Figura 21.16c y d). Las secuencias espaciadoras transcritas se degradan después.

El pre-rRNA también es procesado por la adición de grupos metilo. El principal sitio de metilación es el grupo 2′-hidroxilo de la ribosa, aunque se metilan también algunas bases. El proceso de metilación, así como los cortes en el pre-rRNA, está guiado por un grupo especial de moléculas de RNA, denominadas **RNAsno** (de *small nucleolar*-pequeño nucleolar) que se une a las regiones complementarias de la molécula de pre-rRNA, concretando los lugares específicos de metilación o corte.

La metilación del pre-rRNA se ha estudiado incubando células con S-adenosil metionina radiactiva, que es el donante de grupos metilo en las reacciones celulares de metilación. Cuando las células humanas se incuban con S-adenosil metionina radiactiva, todos los grupos metilo radiactivos incorporados en la molécula de pre-rRNA se encuentran en los productos finales, los rRNA 28S, 18S y 5,8S, lo que indica que los segmentos metilados han sido conservados selectivamente durante el procesamiento del rRNA. La metilación puede ayudar a dirigir el procesamiento del RNA protegiendo regiones específicas del pre-rRNA de los cortes. Se ha visto, en apoyo de esta hipótesis, que privando a las células de uno de los componentes esenciales requeridos para la adición de los grupos metilo se interrumpe el procesamiento de rRNA por corte.

En las células de mamíferos, la molécula de pre-rRNA tiene unos 13.000 nucleótidos y un coeficiente de sedimentación de 45S. Las tres moléculas de rRNA maduras generadas por los cortes en el precusor tienen sólo un 52% del RNA original. El 48% restante (alrededor de 6.200 nucleótidos) son secuencias espaciadoras transcritas que se eliminan y degradan durante los procesos de corte. Los precusores de rRNA de algunos otros eucariotas contienen pequeñas cantidades de secuencias espaciadoras, pero en todos los casos el pre-rRNA es más grande y que el agregado formado por las tres moléculas de rRNA que se forman

Tabla 21.2 RNA de los ribosomas citoplasmáticos

Fuente	Subunidad ribosomal	rRNA: Coeficiente de sedimentación	rRNA: Nucleótidos
Células procariotas	Mayor (50S)	23S	2.900
		5S	120
	Menor (30S)	16S	1.540
Células eucariotas	Mayor (60S)	25–28S	≤4.700
		5,8S	160
		5S	120
	Menor (40S)	18S	1.900

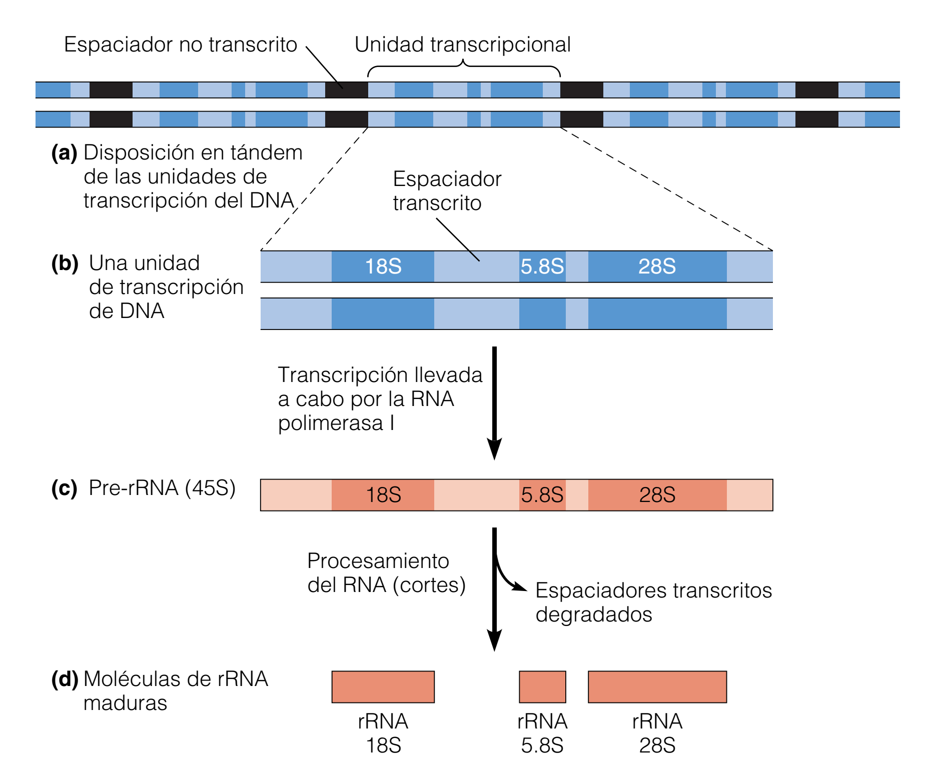


Figura 21.16 Los genes rRNA eucariotas y el procesamiento de los tránscritos primarios. (**a**) La unidad transcripcional eucariota que incluye los genes de los tres rRNAs más grandes se encuentra en múltiples copias, organizadas en conjuntos en tándem. Los espaciadores no transcritos (en negro) separan las distintas unidades. (**b**) Cada unidad transcripcional incluye los genes de los tres rRNAs (en azul oscuro) y cuatro espaciadores transcritos (azul claro). (**c**) La unidad transcripcional es transcrita por la RNA polimerasa I en un solo tránscrito (pre-rRNA) con un coeficiente de sedimentación de unos 45S. (**d**) El procesamiento del RNA genera moléculas de rRNA maduras de 18S, 5,8S y 28S. La ruptura del RNA tiene lugar realmente en una serie de pasos. El orden de estos pasos varía entre las especies y los tipos celulares, pero los productos finales siempre son tres tipos de rRNA.

a partir de ella. Así, siempre se requiere algún tipo de procesamiento.

El procesamiento del pre-rRNA en el nucleolo está acompañado de la unión del RNA con proteínas, que da lugar a las subunidades ribosomales. Además de los rRNA 28S, 18S y 5,8S generados por el procesamiento del pre-rRNA, el proceso de ensamblaje del ribosoma requiere rRNA 5S. El gen que codifica rRNA 5S constituye una unidad transcripcional separada, transcrita por la RNA polimerasa III en lugar de la I. También esta unidad transcripcional se encuentra en múltiples copias ordenadas en conjuntos dispuestos en tándem. Sin embargo, los genes rRNA 5S no se localizan generalmente cerca de los genes de los rRNA más grandes y por lo tanto no tienden a estar asociados con el nucleolo. A diferencia de los pre-rRNA, las moléculas de RNA generadas durante la transcripción de los genes rRNA 5S requieren poco o ningún procesamiento.

Como en los eucariotas, la formación del ribosoma en las células procariotas implica el procesamiento de múltiples rRNA a partir de un precusor más grande. *E.coli*, por ejemplo, tiene siete unidades transcripcionales rRNA repartidas por el genoma. Cada una contiene genes que codifican los tres rRNA procariotas —rRNA 23S, rRNA 16S y rRNA 5S— además de varios genes tRNA. El procesamiento de los tránscritos primarios producidos a partir de estas unidades transcripcionales requiere dos conjuntos de enzimas, unas para los rRNA y otro para los tRNA.

El procesamiento del RNA de transferencia implica la eliminación, adición y modificación química de nucleótidos

Las células sintetizan varias docenas de tipos de tRNA, cada uno diseñado para llevar un aminoácido concreto a uno o más codones del mRNA. Sin embargo, todas las moléculas tienen una estructura común, como se representa en la Figura 21.17. Una molécula de tRNA madura contiene sólo 70-90 nucleótidos, algunos de los cuales están modificados químicamente. El apareamiento entre secuencias de bases complementarias en distintas regiones hace que cada molécula se pliegue formando una estructura secundaria que contiene varias horquillas, representadas en la figura. La mayoría de los tRNA tienen cuatro regiones apareadas, indicadas en la parte b de la figura con puntos azules; en algunos tRNA se encuentra una quinta región apareada en el *bucle variable.* Cada una de estas regiones es un estiramiento corto de la doble hélice de RNA. Los bió-

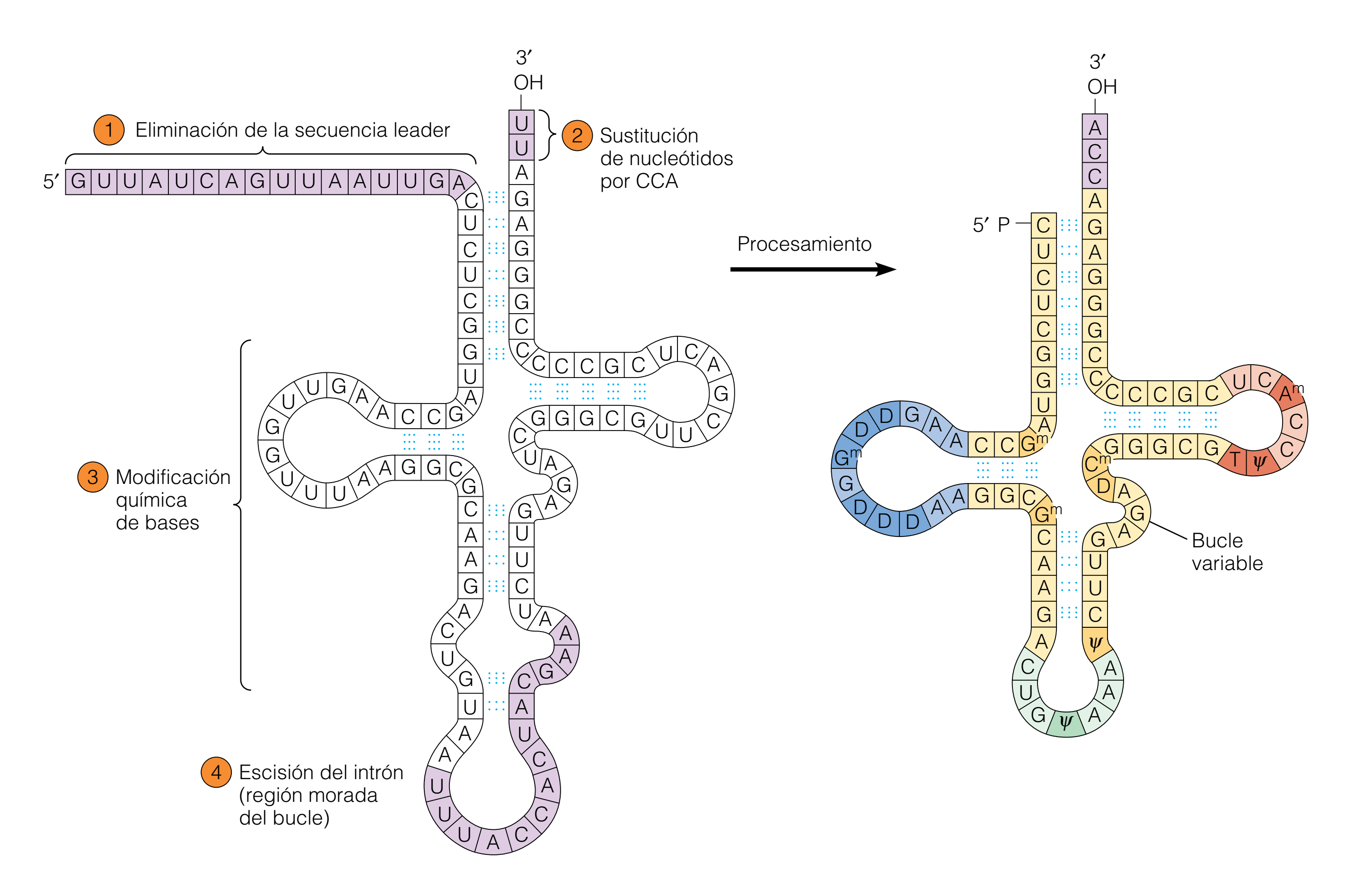


Figura 21.17 Procesamiento y estructura secundaria del RNA de transferencia. (**a**) Todos los genes tRNA se transcriben como precursores que deben ser procesados para generar una molécula de tRNA madura. En este tránscrito primario del tirosina-tRNA de levadura, todas las regiones marcadas en morado son eliminadas durante el procesamiento. El procesamiento de este tRNA implica ① la eliminación de la secuencia *leader* en el extremo 5′, ② la sustitución de dos nucleótidos en 3′ por la secuencia CCA (en la que terminan todas las moléculas de tRNA), ③ la modificación química de ciertas bases y ④ la escisión de un intrón. (**b**) El tRNA maduro en una representación en forma de trébol aplastado que muestra claramente el apareamiento de bases entre segmentos complementarios de la molécula. Las bases modificadas (en colores más oscuros) se abrevian de la siguiente forma: A^m para la metiladenina, G^m para metilcitosina, C^m para metilcitosina, D para el dihidrouracilo, T para la ribotimina y ψ para la pseudouridina.

logos moleculares llaman a la estructura secundaria del tRNA estructura de *trébol* porque recuerda a la estructura de un trébol cuando se dibuja en dos dimensiones. Sin embargo, en su estructura terciaria tridimensional normal la molécula está plegada de manera que la forma se parece realmente a la letra «L» (*véase* Figura 22.3b).

Como el RNA ribosomal, el RNA de transferencia se sintetiza como un precursor tanto en células eucariotas como en procariotas. El procesamiento de estas moléculas de pre-tRNA implica varios pasos, como se muestra en la Figura 21.17a para el tirosina-tRNA. ① En el extremo 5′, se elimina del pre-tRNA una *secuencia leader* corta, de 16 nucleótidos. ② En el extremo 3′ terminal los dos nucleótidos terminales del pre-tRNA se eliminan y sustituyen por el trinucleótido CCA que es característico de todas las moléculas de tRNA. (Algunos tRNA ya tienen CCA en sus tránscritos primarios y por lo tanto no requieren modificación en el extremo 3′.) ③ En una molécula de tRNA típica un 10-15% de los nucleótidos son modificados químicamente durante el procesamiento del pre-tRNA. Las principales modificaciones incluyen la metilación de bases y azúcares, la generación de bases inusuales como el dihidrouracilo, la ribotimina, la pseudouridina y la inosina.

El procesamiento del tirosina-tRNA de levadura se caracteriza también por la eliminación de una secuencia interna de 14 nucleótidos (④), aunque los transcritos de la mayoría de los tRNA no requieren este tipo de escisión. Este segmento interno del tránscrito de RNA que debe eliminarse para generar el RNA maduro se denomina *intrón* de RNA. Consideraremos los intrones más detalladamente durante la exposición del procesamiento del mRNA porque son característicos de todos los precusores de los

mRNA de las células eucariotas. Por ahora, recuerde simplemente que algunos precursores de tRNA eucariotas contienen intrones que deben eliminarse mediante un mecanismo muy preciso que corta el precursor y lo empalma exactamente en la misma localización cada vez. El mecanismo de corte y empalme implica la participación de dos enzimas, una RNA endonucleasa y una RNA ligasa que son similares en distintas especies, incluso entre organismos distantes evolutivamente. En un experimento que demuestra muy claramente este punto se microinyectaron los genes del tirosin-tRNA de levadura, mostrados en la Figura 21.17, en huevos de *Xenopus laevis*, la rana africana o rana de uñas. A pesar la gran distancia evolutiva entre hongos y anfibios, los genes de la levadura introducidos en los huevos de rana se transcribieron y procesaron adecuadamente, incluyendo la eliminación del intrón de 14 nucleótidos.

El procesamiento del RNA mensajero en eucariotas implica la incorporación de un casquete, la adición de una cola de poli(A) y la eliminación de intrones

El mRNA procariota es, en casi todos los genes, una excepción a la generalización de que el RNA requiere procesamiento antes de poder ser utilizado por la célula. La mayoría de los mRNA bacterianos se sintetizan de forma que ya están listos para la traducción, incluso antes que se haya completado la transcripción. Es más, la transcripción en bacterias no está separada por una barrera (membrana) de los ribosomas, que son responsables de la traducción, de manera que las moléculas de mRNA bacteriano que están siendo sintetizadas por la RNA polimerasa suelen tener ribosomas ya asociados. La micrografía electrónica de la Figura 21.18 muestra este acoplamiento de la transcripción y la traducción en una célula bacteriana.

En los eucariotas, por otro lado, la transcripción y la traducción están separadas tanto en el tiempo como en el espacio: la transcripción tiene lugar en el núcleo, mientras que la traducción se da fundamentalmente en el citoplasma. Se requiere un procesamiento sustancial en el núcleo para convertir los tránscritos primarios en moléculas de mRNA listas para ser transportadas al citoplasma y traducidas. Aunque cada unidad transcripcional de mRNA eucariota codifica sólo un polipéptido, los tránscritos primarios suelen ser muy largos, generalmente de entre 2.000 y 20.000 nucleótidos. Esta heterogeneidad en el tamaño se refleja en el término *RNA heterogéneo nuclear (RNAhn)* que se ha aplicado para denominar al RNA no ribosomal y no transportado que se encuentra en el núcleo de las células eucariotas. El RNAhn consta de una mezcla de moléculas de mRNA y sus precursores, pre-mRNA. La conversión de las moléculas de pre-mRNA en moléculas de mRNA funcionales requiere normalmente la eliminación de secuencias de nucleótidos así como la adición de casquetes en 5′ y colas en 3′, como describiremos en las siguientes secciones.

Adición de casquetes en 5′ y de la cola de poli(A) en 3′. La mayoría de las moléculas de mRNA eucariotas llevan modificaciones distintivas en ambos extremos. En el extremo 5′, todas tienen un nucleótido modificado denominado casquete 5′, y en el extremo 3′ suelen tener un segmento largo de nucleótidos de adenina conocido como **cola de poli(A).**

El casquete en 5′ es simplemente un nucleótido guanosina que ha sido metilado en la posición 7 del anillo de purina y es «reverso»; esto quiere decir que el enlace que une el extremo 5′ de la molécula de RNA es un enlace 5′ → 5′ en lugar del 3′ → 5′ habitual (Figura 21.19). Esta característica distintiva del mRNA eucariota se añade al tránscrito primario poco después de la iniciación de la síntesis del RNA. Como parte del proceso de adición del casquete, los anillos de ribosa del primer, y a menudo también del segundo, nucleótido del RNA pueden ser metilados, como se muestra en la Figura 21.19. El casquete 5′ contribuye a la estabilidad del mRNA protegiendo a la molécula

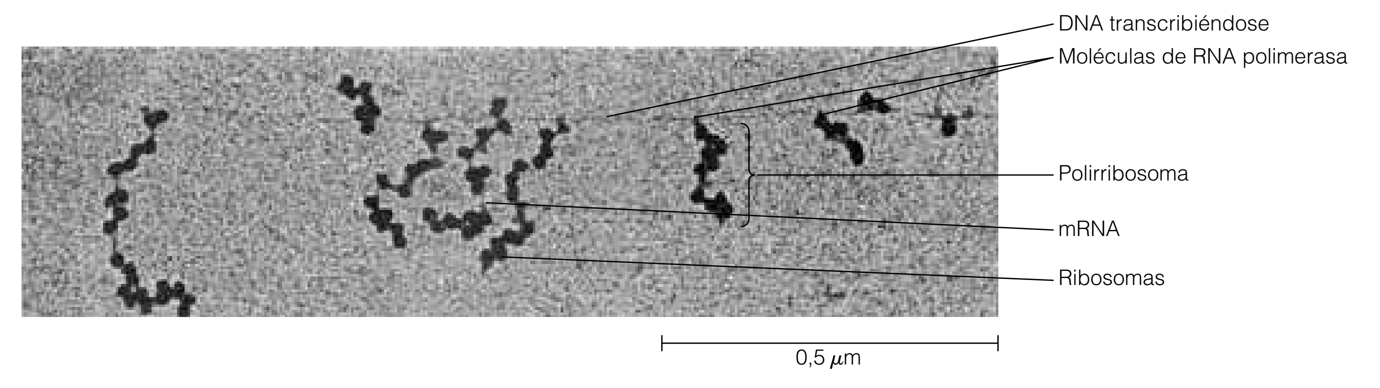


Figura 21.18 Acoplamiento de la transcripción y de la traducción en las células bacterianas. Esta micrografía electrónica muestra el DNA de *E.coli* siendo transcrito por moléculas de RNA polimerasa que se están moviendo de derecha a izquierda. Acoplada a cada molécula de polimerasa se encuentra una hebra de mRNA que está todavía en proceso de transcripción. Las grandes partículas oscuras acopladas a cada mRNA en formación son ribosomas que están traduciendo activamente el mRNA parcialmente sintetizado. (Los polipéptidos que se están sintetizando no son visibles.) Un conjunto de ribosomas acoplados a una hebra de mRNA sencilla se denomina polirribosoma (MET-microscopía electrónica de transmisión).

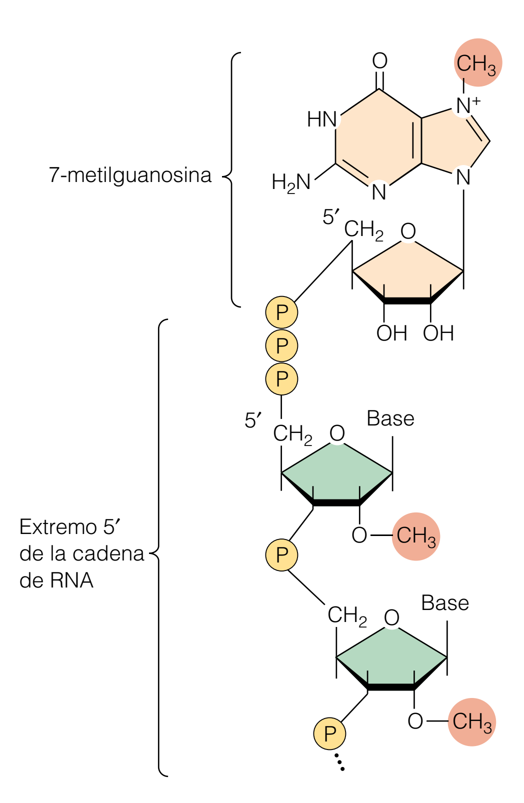


Figura 21.19 Estructura del casquete situado en el extremo 5′ del pre-mRNA eucariota y las moléculas de mRNA. Los grupos metilo acoplados a las dos primeras ribosas del extremo 5′ de la cadena de RNA no siempre están presentes. Observe que el enlace entre el RNA y la 7-metilguanosina es 5′ a 5′ en lugar del 5′ a 3′ habitual.

de la degradación por nucleasas que atacan al RNA en el extremo 5′. El casquete tiene también un papel importante en el posicionamiento del mRNA en el ribosoma para la iniciación de la traducción.

Además del casquete 5′, en el extremo 3′ de la mayoría de las moléculas de mRNA eucariota está presente una cola de poli(A) de unos 50-250 nucleótidos. En las células animales, sólo los mRNA de las histonas principales carecen de ella. Está claro que la cola de poli(A) debe añadirse tras la transcripción porque los genes no contienen los largos segmentos de nucleótidos de timina (T) que serían el molde para la adición de la cola de poli(A). Una evidencia directa de esta conclusión ha venido dada por el aislamiento de la enzima poli(A) polimerasa, que cataliza la adición de secuencias de poli(A) al RNA sin la necesidad de un DNA molde.

La adición de la cola de poli(A) es parte del proceso que crea el extremo 3′ en las moléculas de mRNA eucariotas. A diferencia de lo que sucede en las bacterias, donde las secuencias de terminación específicas interrumpen la transcripción en el extremo 3′ de las moléculas de mRNA recién formadas, la transcripción de los pre-mRNA eucariotas suele tener lugar cientos o incluso miles de nucleótidos más allá del lugar destinado a ser el extremo 3′ de la molécula final de mRNA. Una señal especial —que consiste en una secuencia AAUAAA localizada ligeramente corriente arriba de este sitio y un elemento rico en GU y/o U corriente debajo de este lugar— determina dónde debe añadirse la cola de poli(A). Como se muestra en la Figura 21.20, este elemento de señalización determina el corte de los primeros 10-35 nucleótidos transcritos corriente abajo de la secuencia AAUAAA y la poli(A) polimerasa cataliza la formación de la cola de poli(A). Además de crear la cola de poli(A), los pasos de procesamiento asociados a la señal AAUAAA podrían ayudar a desencadenar la terminación de la transcripción.

La cola de poli(A) parece tener varias funciones. Igual que el casquete en 5′, la cola protege al mRNA del ataque de nucleasas y, en consecuencia, la longitud de la cola de poli(A) influye en la estabilidad del mRNA (cuanto más larga sea la cola, más larga será la vida del mRNA en el citoplasma). Además, la cola de poli(A) es reconocida por proteínas específicas implicadas en el transporte de mRNA del núcleo al citoplasma y también puede ayudar a los ribosomas a reconocer al mRNA como molécula base para la traducción. En el laboratorio, las colas de poli(A) pueden usarse para aislar mRNA de los rRNA y tRNA, más abundantes. El RNA extraído de las células se pasa simplemente por una columna empaquetada con partículas recubiertas con poli(dT), que son moléculas de RNA de cadena sencilla formadas sólo por nucleótidos de timina. Las moléculas con la cola de poli(A) se unen al poli(T) por complementariedad de bases, mientras que el resto de las moléculas pasan a través de la columna sin ser retenidas. El mRNA que contiene la cola de poli(A) se puede eluir de la columna cambiando las condiciones iónicas.

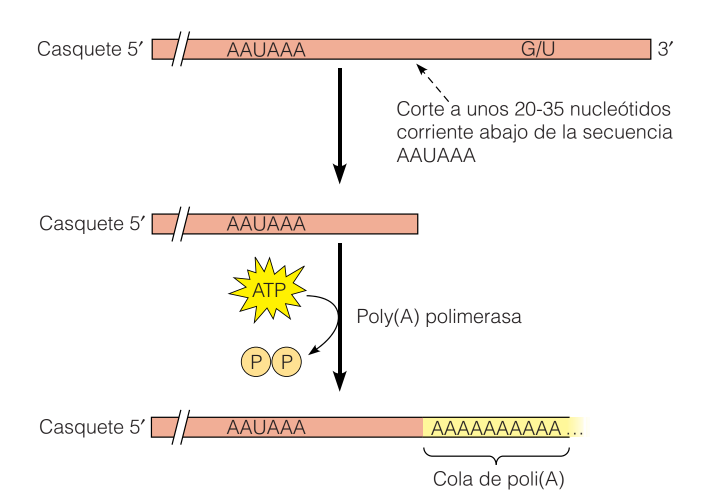


Figura 21.20 Adición de la cola de poli(A) al pre-mRNA. La transcripción de los pre-mRNA suele tener lugar mas allá del extremo 3′ del mRNA maduro. La cadena de RNA se corta a unos 10-35 nucleótidos corriente abajo de la secuencia especial AAUAAA, y esto es seguido por la adición de una cola de poli(A) catalizada por la poli(A) polimerasa. La secuencia AAUAAA se distingue por la presencia corriente abajo de un elemento acompañante rico en GU y/o U (designado G/U en el diagrama).

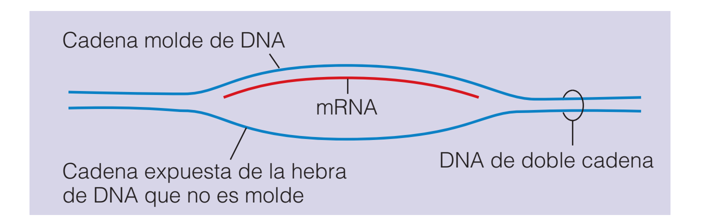
El descubrimiento de los intrones. En las células eucariotas, los precusores de la mayoría de los mRNA (y algunos tRNA y rRNA) contienen **intrones**, que son *secuencias situadas dentro de los tránscritos primarios que no aparecen en los RNA funcionales maduros*. El descubrimiento de los intrones fue una gran sorpresa para los biólogos. Se había demostrado anteriormente, en numerosos genes bacterianos, que la secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica producida por un gen se corresponde exactamente con la secuencia de nucleótidos del DNA. Esta relación fue demostrada por primera vez en los experimentos de colinearidad de Charles Yanofsky a principios de los 60, y como poco después se dispuso de métodos de secuenciación de proteínas y nucleótidos, se pudo confirmar por comparación directa de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos. Los biólogos asumieron la misma relación en eucariotas.

Resultó, por lo tanto, sorprendente que en 1977 varios grupos identificaran genes eucariotas que no seguían este patrón, sino que eran interrumpidos por segmentos de nucleótidos —intrones— que no estaban representados ni por mRNA ni por su proteína producto. La existencia de intrones fue demostrada por primera vez por *R looping*, una técnica en la que el RNA de cadena sencilla se hibrida con DNA de doble cadena en condiciones que favorecen la formación de híbridos entre regiones complementarias de RNA y DNA. Para comprender cómo esta técnica permitió el descubrimiento de los intrones, vamos a examinar primero qué pasa con un gen que *no lleva* intrones. La Figura 21.21A representa el resultado esperado cuando se hibrida un mRNA procariota con un DNA de doble cadena correspondiente al gen a partir del que se ha transcrito el mRNA. El mRNA hibrida con la hebra molde del DNA, desplazando la otra hebra como un bucle de DNA que se puede identificar fácilmente por microscopía electrónica.

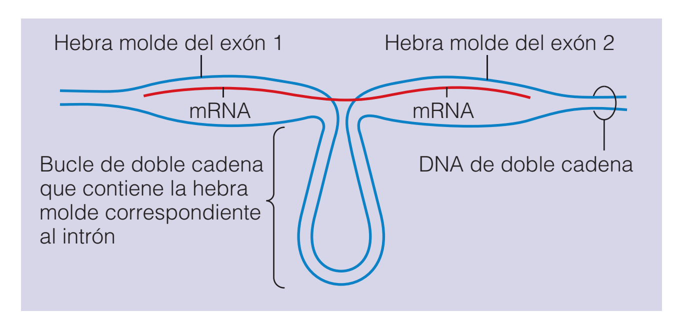
Si los genes eucariotas estuviesen construidos a partir de secuencias lineales de nucleótidos, se esperaría que sus mRNA generasen un patrón de bucle similar. Sin embargo, en los experimentos reales con mRNA que codifican proteínas como la β-globina y la ovoalbúmina de pollo, el resultado fue sorprendente ya que se formaban múltiples bucles (Figura 21.21b). Este resultado inesperado indicaba que las secuencias de DNA que codifican varios RNA eucariotas no son continuas, sino que están separadas por secuencias que no aparecen en el mRNA final. Las secuencias que interrumpen la continuidad lineal de las regiones codificantes de un gen son los intrones, y las secuencias destinadas a aparecer en el mRNA final se conocen como **exones**.

Una vez que se describieron en unos pocos genes, los intrones empezaron a aparecer por todas partes, especialmente a medida que se aplicaron las técnicas de restricción enzimática a una amplia variedad de genes eucariotas. La Figura 21.22 ilustra cómo se puede utilizar el mapeo por restricción para identificar la presencia de intrones. En estos estudios, los mapas de restricción de los genes cromosómicos se comparan con los mapas de restricción de los DNAc (DNA complementarios), obtenidos a partir de mRNA por transcripción mediante la transcriptasa inversa. La observación de diferencias significativas en los mapas de restricción de un gen, su DNAc correspondiente, sugiere la presencia de intrones en el gen que no están presentes en el mRNA final.

La utilización del mapeo por restricción y de las técnicas de secuenciación de DNA han permitido concluir que los intrones están presentes en la mayoría de los genes que codifican proteínas en eucariotas multicelulares, aunque el tamaño y la cantidad de intrones puede variar considerablemente (Tabla 21.3). El gen de la β-globina humana, por ejemplo, tiene sólo dos intrones, uno de 120 pb y el otro de 550 pb. Juntos, suponen el 40% de la longitud total del gen. En muchos genes de mamíferos hay incluso proporciones mayores de intrones. Un ejemplo extremo es, por ejemplo, el gen de la distrofina humana, cuya mutación causa de la distrofia muscular de Duchenne. Este gen tiene más de 2 millones de pares de bases y tiene 85 intrones, que representan más del 99% del DNA del gen.

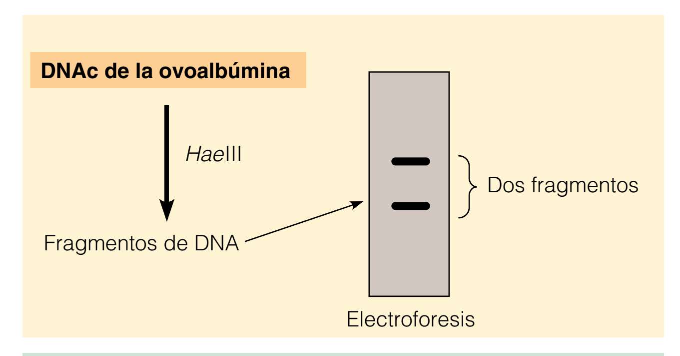


(a)



(b)

Figura 21.21 Demostración de la presencia de intrones en los genes que codifican proteínas. Las moléculas de mRNA maduro se hibridaron con el DNA (genes) a partir de los cuales se transcriben. Los híbridos resultantes se examinaron después al microscopio electrónico. Los diagramas muestran los resultados. (**a**) Hibridación de una molécula de mRNA procariota con el DNA de su gen, que carece de intrones. La hebra de DNA mostrada forma un amplio bucle. (**b**) Hibridación de una molécula de mRNA eucariota con su gen, que tiene un intrón. En este caso se observan tres bucles —dos bucles de DNA de cadena sencilla donde el mRNA ha hibridado con el DNA molde y un bucle de DNA de doble cadena. El bucle de doble cadena representa el intrón, que contiene secuencias que no aparecen en el mRNA final.



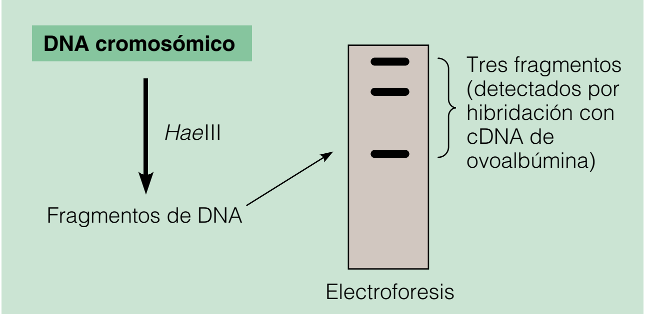


Figura 21.22 Detección de intrones usando enzimas de restricción. Cortando cDNA de ovoalbúmina de pollo con la enzima de restricción *HaeIII* se generan dos fragmentos, lo que indica la presencia de un sitio *HaeIII* en la molécula de cDNA. El corte de DNA cromosómico con la misma enzima, *HaeIII*, genera tres fragmentos que contienen secuencias de la ovoalbúmina, lo que indica la presencia de dos sitios *HaeIII* en el gen de la ovoalbúmina. El sitio *HaeIII* adicional está situado en un intrón y por lo tanto no aparece en la molécula de mRNA final de la ovoalbúmina, de la que deriva el cDNA de esta proteína.

Tabla 21.3 Algunos ejemplos de genes con intrones

Gen	Organismo	Número de intrones	Número de exones
Actina	*Drosophilia*	1	2
β-globina	Humano	2	3
Insulina	Humano	2	3
Actina	Pollo	3	4
Albúmina	Humano	14	15
Tiroglobulina	Humano	36	37
Colágeno	Pollo	50	51
Titina	Humano	233	234

El descubrimiento de intrones que no aparecían en los mRNA maduros planteó la cuestión de si los intrones presentes en el DNA son transcritos en el tránscrito primario (pre-mRNA). Esta cuestión se resolvió mediante experimentos en los que se mezclan el pre-mRNA y el DNA, y se examina el híbrido resultante por microscopía electrónica. A diferencia de los híbridos que se forman entre el mRNA y el DNA, que presentan múltiples bucles R, y donde la molécula de DNA contiene secuencias que no están presentes en el mRNA (Figura 21.21b), el pre-mRNA hibrida en un segmento continuo de la molécula DNA, formando un solo bucle R (como en la Figura 21.21a). Así, los científicos han concluido que las moléculas de pre-mRNA representan copias continuas de sus correspondientes genes y contienen tanto intrones como secuencias destinadas a formar parte del mRNA final. Esto significa que la conversión del pre-mRNA en mRNA requiere mecanismos específicos para la eliminación de intrones, como describiremos a continuación.

Los espliceosomas eliminan los intrones del pre-mRNA

Para producir una molécula funcional de mRNA a partir de un pre-mRNA que contiene intrones, los eucariotas deben eliminar de alguna forma los intrones y empalmar los segmentos de RNA restantes (exones). El proceso completo de eliminación de intrones y empalme de exones se denomina **ayuste (splicing) del RNA**. Como ejemplo, la Figura 21.23 muestra el tránscrito primario (pre-mRNA) del gen de la β-globina y el producto final maduro (mRNA) que se produce después de la eliminación de los dos intrones.

El ayuste del RNA debe ser muy preciso, ya que un error en un solo nucleótido podría alterar el marco de lectura del mRNA e inutilizarlo. El ayuste adecuado puede, de hecho, verse alterado por la simple modificación de la secuencia de bases de un segmento corto localizado al final de un intrón, lo que indica que estas secuencias determinan la localización exacta de los sitios de empalme 5′ y 3′ —es decir, los puntos donde se cortan los dos extremos de un intrón durante su eliminación—. El análisis de secuencias de cientos de intrones distintos ha revelado que el extremo 5′ de un intrón empieza normalmente con la secuencia

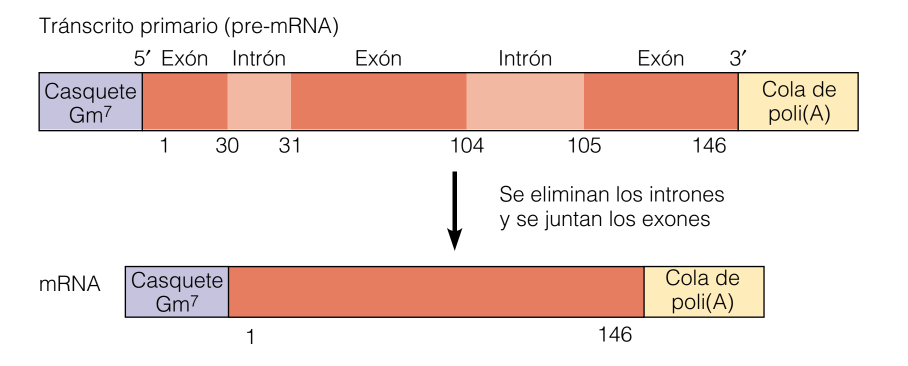


Figura 21.23 Una visión general del ayuste. La adición de la cola y el casquete al tránscrito primario del gen de la β-globina humana contiene tres exones (en rojo oscuro) y dos intrones (en rojo claro). Los números hacen referencia a las posiciones de los codones en el mRNA final. En el mRNA maduro que se forma tras el ayuste cuando los intrones se han eliminado y los exones se han unido para dar lugar a una molécula con una secuencia codificante continua. Los ribosomas celulares traducirán este mensaje en una cadena polipeptídica de 146 aminoácidos.

GU y el extremo 3′ termina con la secuencia AG. Además, un segmento de bases corto adyacente a estas secuencias GU y AG tiende a ser similar entre distintos intrones. La secuencia de bases del resto del intrón parece ser irrelevante para el proceso de ayuste. Aunque los intrones pueden variar desde unas pocas docenas a miles de nucleótidos de longitud, la mayoría de los intrones se pueden eliminar artificialmente sin alterar el proceso de ayuste. Hay una secuencia especial localizada varias docenas de nucleótidos corriente arriba del extremo 3′del intrón a la que se conoce como punto de ramificación y que es una excepción. El punto de ramificación tiene un papel importante en el mecanismo de eliminación de intrones.

El proceso de eliminación de intrones está catalizado por un complejo proteico denominado **espliceosoma**, que se ensambla a partir de grupo más pequeño de complejos de proteínas-RNA conocidas como RNPsn (ribonucleoproteínas pequeñas nucleolares) y otras proteínas adicionales. Cada RNPsn contiene una o dos moléculas pequeñas de un tipo especial de RNA denominado RNAsn (pequeño nucleolar). Durante el ayuste del RNA, un grupo de varias RNPsn se unen secuencialmente a un intrón para dar lugar al espliceosoma (Figura 21.24). El primer paso de este proceso es la unión de un RNPsn denominado U1, cuyo RNA contiene una secuencia de nucleótidos que le permite aparearse con el extremo 5′. Una segunda RNPsn, denominada U2, se une después a la secuencia del punto de ramificación. Por último, otro grupo de RNPsn (U4/U6 y U5) junta los dos extremos del intrón para generar el espliceosoma maduro. El espliceosoma completo, que contiene cinco RNA y más de 50 proteínas, es un gran complejo, tan grande como un ribosoma.

En este estado, el pre-mRNA se corta en el lugar de empalme en 5′ y el nuevo extremo 5′ del intrón se une covalentemente a un residuo de adenina localizado en la secuencia punto de ramificación, generando una estructura en forma de bucle denominada *lazo.* El sitio de empalme en 3′ se corta y se unen los dos extremos del exón, liberando el intrón para su posterior degradación. Las micrografías electrónicas han revelado la presencia de espliceosomas maduros y snRNPs unidos a moléculas de RNA que todavía están en proceso de síntesis (Figura 21.25), lo que indica que la eliminación de intrones comienza antes de que se haya completado la transcripción del pre-mRNA. Aunque no se muestra en la figura, tanto el tránscrito pri-

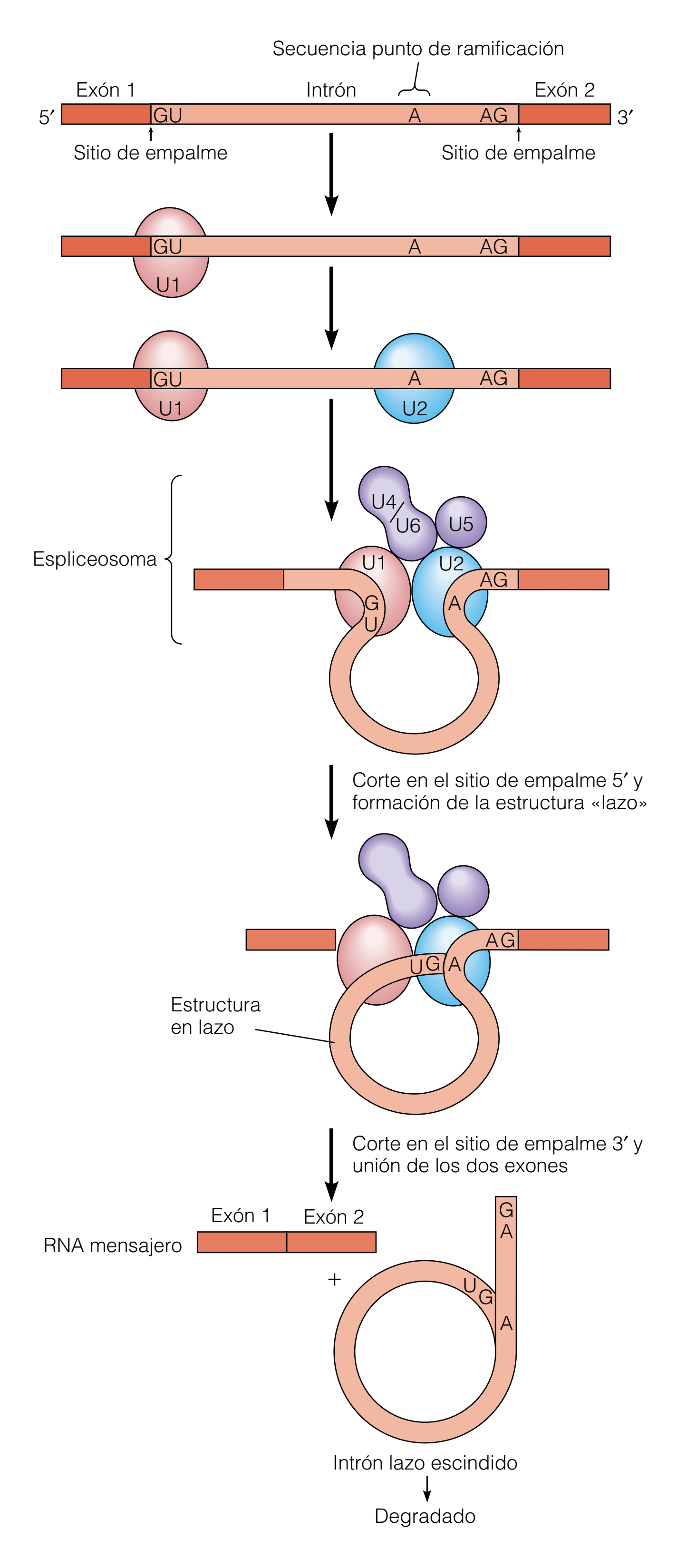


Figura 21.24 Eliminación de los intrones por el espliceosoma. El espliceosoma es un complejo RNA-proteína que lleva a cabo el proceso de ayuste del intrón que contiene el pre-mRNA en el núcleo de la célula eucariota. El sustrato es, en este caso, una molécula de pre-mRNA con dos exones y un intrón. Por un proceso de varios pasos el pre-mRNA se ensambla con las U1 snRNP, U2 snRNP y U4/U6 y U5 snRNP (además de con algunos factores de ayuste no-snRNPs) formando el espliceosoma maduro. El pre-mRNA se corta después en el sitio de empalme 5′ y el nuevo extremo 5′ liberado se une al nucleótido de adenina (A) situado en la secuencia del punto de ramificación, generando una estructura en forma de bucle (lazo). El sitio de empalme 3′ se corta y se unen los dos extremos del exón, liberando el intrón para su posterior degradación.

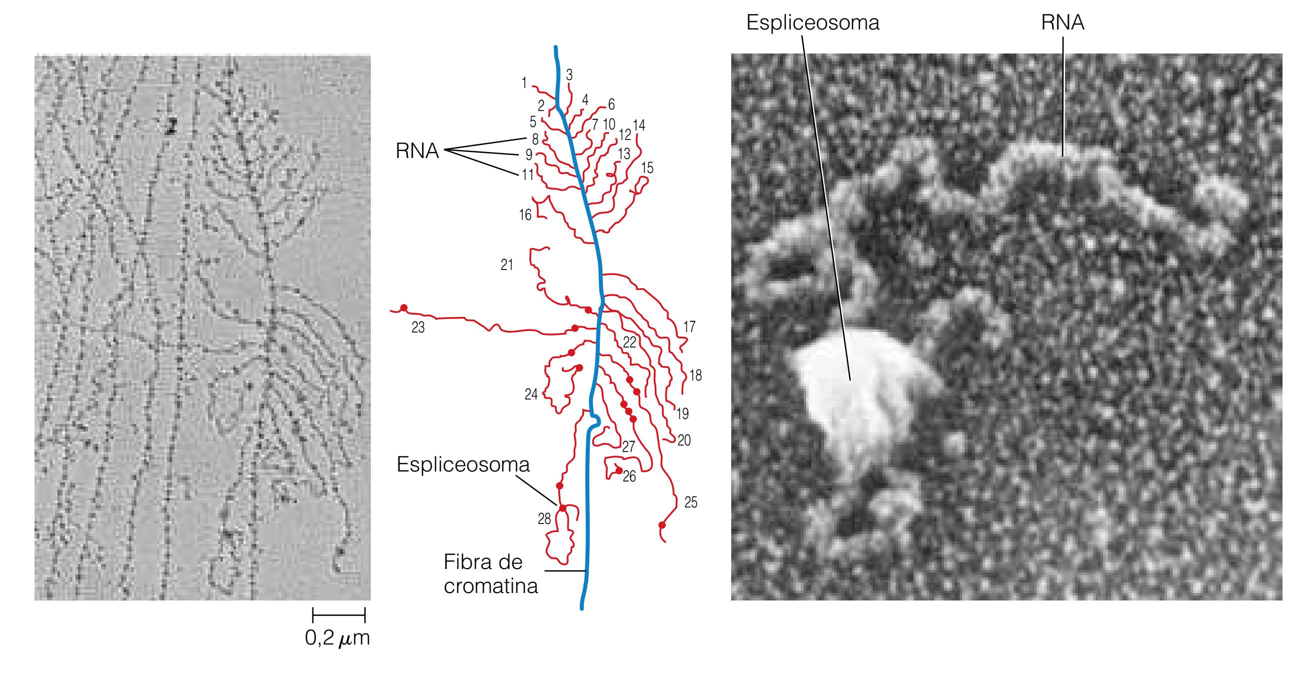


Figura 21.25 **Visualización de espliceosomas por microscopía electrónica.** La micrografía electrónica de la izquierda muestra fibras de cromatina que se están transcribiendo. De la fibra de cromatina salen muchos tránscritos de RNA formados (cada uno numerado por separado en la figura). Los gránulos más oscuros de los tránscritos de RNA representan snRNPs que están empezando a ensamblar el espliceosoma. En el caso del tránscrito de RNA número 28, se ha formado un espliceosoma maduro. La micrografía de mayor aumento de la derecha muestra una molécula de RNA sencilla con un espliceosoma unido (METs).

mario como el mRNA maduro están asociados en toda su longitud con proteínas no-snRNP, formando **partículas RNP** que se parecen a nucleosomas. El mRNA permanece asociado con estas proteínas hasta que entra en el citoplasma, donde se une con otras proteínas y subunidades ribosomales.

Además de los principales tipos de intrones, caracterizados por las secuencias GU y AG localizadas en las regiones de unión 5′ y 3′ respectivamente, se han descubierto una segunda clase de intrones que contienen secuencias AU y AC en estos dos sitios. Estos intrones «AU-AC» suelen ser procesados por un segundo tipo de espliceosoma que difiere del espliceosoma de la Figura 21.24 en la composición de snRNP. A pesar de la complejidad que supone la existencia de varios tipos de intrones y espliceosomas, hay un denominador común: las moléculas de RNAsn que se encuentran en los espliceosomas parecen estar implicadas en el mecanismo catalítico de ayuste así como en el ensamblaje del espliceosoma y el reconocimiento del sitio de ayuste. La idea del papel catalítico de los RNAsn surgió a partir del descubrimiento de los intrones auto-catalíticos, nuestro siguiente asunto.

Algunos intrones son autocatalíticos

Aunque casi siempre se requiere la participación de los espliceosomas para la eliminación de intrones, algunos genes tienen *intrones autocatalíticos*. El tránscrito de RNA de este gen puede llevar a cabo el proceso completo de ayuste en ausencia de proteínas (por ejemplo, en un tubo de ensayo); el intrón de RNA cataliza por sí solo el proceso. Como describimos en el Capítulo 6, estas moléculas de RNA que tienen actividad catalítica en ausencia de proteínas se denominan *ribozimas*.

Hay dos tipos de intrones en los que el intrón de RNA funciona como ribozima que cataliza su propia eliminación. El primer tipo, denominado Grupo I de intrones, está presente en los genomas mitocondriales de hongos (ej: levaduras), en genes rRNA y en genes que codifican componentes de sistema de transporte electrónico; también se dan en genes mitocondriales de plantas, en los genes rRNA y tRNA de cloroplastos, en genes rRNA nucleares de algunos eucariotas unicelulares, en algunos genes tRNA de bacterias y en algunos genes de bacteriofagos que codifican mRNA. Los intrones RNA del Grupo I se eliminan en forma de fragmentos de RNA lineales.

Por el contrario, el *Grupo II de intrones* se elimina como lazos en los que una adenina del intrón forma el punto de ramificación, igual que en el mecanismo del espliceosoma. Los intrones del grupo II se encuentran en algunos genes mitocondriales y en cloroplastos de plantas y eucariotas unicelulares y los genomas de algunas arqueas y bacterias. Los biólogos creen que el mecanismo de ayuste predominante en la actualidad, basado en los espliceosomas, evolucionó a partir de los intrones del Grupo II, donde el papel catalítico del RNA lo tomaron las moléculas de snRNA del

espliceosoma. Un apoyo a esta idea vino del descubrimiento de que moléculas de RNA libres de proteínas podían catalizar una reacción relacionada estrechamente con el primer paso de la reacción de ayuste que implica a la adenina del punto de ramificación.

¿Por qué los genes eucariotas tienen intrones?

La cuestión clave sobre los intrones es ¿por qué están presentes en casi todos los eucariotas multicelulares? ¿Por qué las células tienen tanto DNA que parece no tener una función codificante?¿Por qué, en una generación tras otra de células, se invierte tanta energía en sintetizar segmentos de DNA —y de tránscritos de RNA— que parecen no ser útiles y están destinados a ser desechos en el proceso de ayuste?

No es cierto que los intrones nunca tengan funciones en sí mismos. En algunos casos, los intrones RNA se procesan generando productos funcionales en lugar de degradarse. Por ejemplo, algunos RNAsno —cuyo papel en la metilación y corte del pre-mRNA se describió al principio del capítulo— derivan de intrones que se eliminan del pre-mRNA y se procesan después para dar RNAsno. En algunos casos, los intrones son incluso traducidos a proteínas.

A pesar de estas excepciones, la mayoría de los intrones son eliminados sin haber tenido ninguna función obvia. Una posible razón para esta organización tan inútil aparentemente es que la presencia de intrones permita que los pre-mRNA se procesen mediante ayuste de distintas formas, generando distintos mRNA y por lo tanto distintos polipéptidos a partir de un mismo gen. Este fenómeno, denominado **ayuste alternativo**, es posible por el hecho de que los sitios concretos de ayuste pueden ser o no activados. Como resultado, una molécula de pre-mRNA que contiene muchos intrones puede ser procesada por ayuste en docenas o incluso cientos de formas distintas. La capacidad de producir múltiples mRNA a partir de un mismo gen puede ayudar a explicar cómo se ha conseguido tal complejidad en los vertebrados sin un incremento sustancial en el número de genes en comparación con organismos más sencillos (recuerde del Capítulo 18 que los humanos tienen sólo aproximadamente el doble de genes que los gusanos o las moscas). Más de la mitad de los genes humanos dan lugar a pre-mRNA que se procesan de más de una forma, lo que permite que los 30.000 genes humanos produzcan mRNA que codifican más de 100.000 polipéptidos.

Se ha propuesto también que los intrones pueden tener un papel *evolutivo* interesante. Es posible que los intrones faciliten la aparición de nuevas proteínas potencialmente útiles. Este papel potencial está basado en el descubrimiento de que los exones suelen codificar regiones funcionalmente distintas en las cadenas polipeptídicas, que se pliegan independientemente como dominios separados (Figura 21.26). Por ejemplo, los tres exones del gen de la β-globina corresponden a regiones estructural y funcionalmente distintas de la cadena polipeptídica. Este tipo de ordenamiento sugiere que los genes que codifican proteínas con muchos exones puedan haberse ensamblado durante la evolución a partir de lo que originalmente fueron entidades separadas. Los intrones pueden estar implicados de dos formas, que dependen en ambos casos del hecho de los intrones son segmentos largos de DNA donde puede darse la recombinación génica sin afectar a las secuencias codificantes. Primero, el entrecruzamiento entre intrones de distintos genes puede suponer la creación de genes que contienen nuevas combinaciones de exones —«*barajeo*» *de exones*—. En segundo lugar, la recombinación con otras combinaciones de intrones puede producir fácilmente duplicados de exones concretos dentro del mismo gen. Estos exones podrían quedar como duplicados exactos, o alguno podría mutar a una secuencia que generase una nueva actividad en el polipéptido.

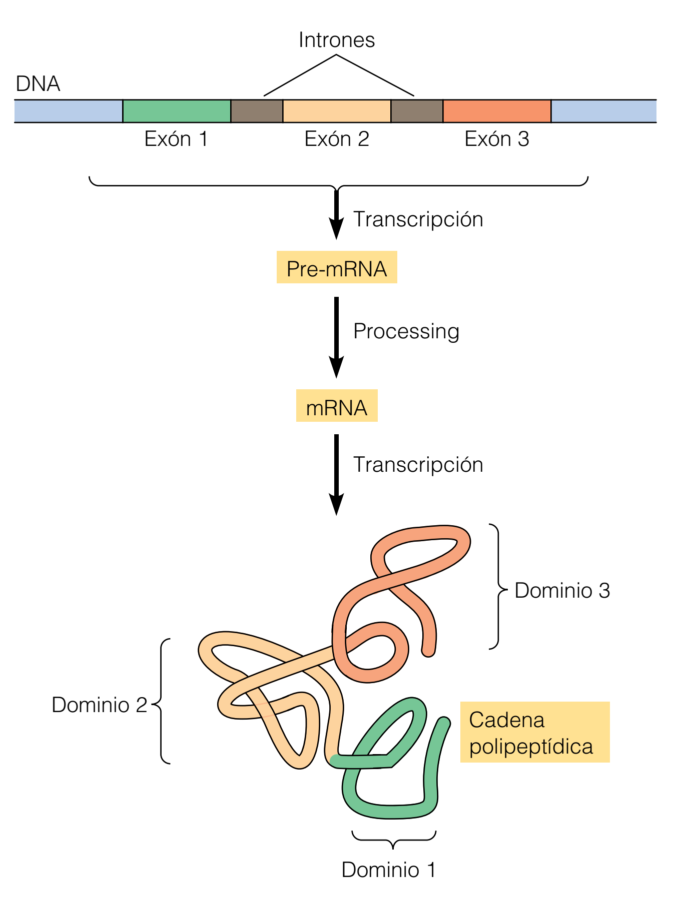


Figura 21.26 El supuesto papel de los exones en la codificación de dominios proteicos. Cada dominio representa una región separada de una cadena polipeptídica que es capaz de plegarse independientemente en una unidad funcional.

Muchos biólogos creen que los intrones son, de hecho, reliquias de organismos unicelulares antiguos que fueron los antecesores de todos los organismos actuales, tanto procariotas como eucariotas. El descubrimiento de que los intrones están presentes en algunos genes de arqueas y bacterias apoyaría esta idea. Después de billones de años, la

presión evolutiva para la optimización de los genomas de estos organismos unicelulares habría supuesto la pérdida de la mayoría de los intrones que presentaban originalmente.

La edición del RNA permite la alteración de la secuencia del mRNA

Una década después de que se hubieran descubierto los intrones y el mecanismo de ayuste del RNA, los biólogos moleculares se vieron sorprendidos por el descubrimiento de otro tipo de procesamiento del mRNA, denominado **edición del RNA**. Durante la edición del RNA, cualquier lugar dentro de la secuencia codificante de un mRNA, desde un nucleótido hasta cientos de ellos, puede sufrir adición, eliminación o alteración química. Estos cambios a menudo generan nuevos sitios de iniciación y/o codones stop y pueden alterar el marco de lectura del mensaje. Los ejemplos mejor estudiados de edición del RNA se encuentran en los mRNA mitocondriales de los tripanosomas, que son protozoos parásitos. En estos mRNA, la edición implica la inserción y deleción de múltiples nucleótidos de uracilo en varios puntos del mRNA. La información para esta edición está localizada en pequeñas moléculas de RNA denominadas RNA *guía*, que están codificadas aparentemente por genes mitocondriales separados de los genes mRNA. En uno de los mecanismos de edición propuestos, los puentes de hidrógeno formados entre regiones complementarias cortas del RNA guía y el mRNA acercan los RNAs, y las secuencias cercanas de U's del RNA guía se empalman en el mRNA.

En los mRNA de mitocondrias y cloroplastos de plantas en floración tiene lugar un tipo distinto de edición. En estos casos, no se insertan ni eliminan nucleótidos pero las C's se convierten en U's, y viceversa. Por reacciones de desaminación, y aminación, se han descubierto conversiones de bases similares a éstas en algunos mRNA tránscritos de genes nucleares de células animales. Por ejemplo, un simple codón en el mRNA tránscrito del gen de la apolipoproteína B de mamíferos, experimenta una conversión de C a U durante la edición del RNA. Otro tipo de edición del RNA, detectado en el núcleo de células animales, convierte la adenosina (A) en inopina (I), que se asemeja a la guanosina (G) en sus propiedades de apareamiento. El resultado neto es, por lo tanto, equivalente a una conversión de A en G.

En todas sus manifestaciones, la edición del RNA parece relativamente rara. Sin embargo, su existencia da una razón para ser cautelosos al inferir una secuencia de RNA o polipeptídica a partir de las secuencias de DNA genómico. Por ejemplo, se observaron muchas discrepancias cuando se compararon por primera vez las secuencias de aminoácidos de proteínas producidas por genes mitocondriales de plantas, con las secuencias de aminoácidos que podían predecirse en base a la secuencia del DNA mitocondrial. Aunque algunas de estas discrepancias se pueden explicar por el uso de codones atípicos (descritos al principio del capítulo), la mayoría de los aminoácidos inesperados se explicaban porque la edición del RNA altera la secuencia base de varios codones del mRNA, provocando la incorporación de aminoácidos inesperados en base a la secuencia de DNA del gen.

La edición de los ácidos nucleicos no está restringida al RNA. Las células eucariotas también poseen una enzima editora del DNA, conocida como APOBEC3G, que puede inactivar retrovirus catalizando conversiones de G en U en la hebra de DNA inicial que se produce cuando el RNA viral es copiado a DNA por la transcriptasa inversa (paso 2 de la Figura 21A.1). Las conversiones de C en U en la primera cadena producen conversiones de G en A en la cadena de DNA complementaria, introduciendo entonces mutaciones que debilitan al virus. Para defenderse de este ataque, el VIH y otros retrovirus producen una proteína denominada *Vif*, dirigida a la destrucción de APOBEC3G. Debido a que la supresión de APOBEC3G es esencial para que pueda tener lugar la infección retroviral, el bloqueo de Vif puede ser una estrategia útil para el desarrollo de nuevos tratamientos contra el VIH/SIDA.

Aspectos clave del metabolismo del mRNA

Antes de terminar este capítulo deberíamos resaltar dos aspectos clave del metabolismo del mRNA que son importantes para nuestra comprensión general de cómo se comportan las moléculas de mRNA dentro de la célula. Son la corta vida media de la mayoría de los mRNA y la capacidad del mRNA de amplificar la información genética.

La mayoría de las moléculas de mRNA tienen una vida media relativamente corta

La mayoría de las moléculas de mRNA tienen una alta *tasa de intercambio* —ésta es la tasa a la que las moléculas son degradadas y posteriormente sustituidas por versiones recién sintetizadas—. En este aspecto, el mRNA se diferencia de otras formas mayoritarias de RNA, el rRNA y el tRNA, que se caracterizan por su estabilidad. Debido a su vida media corta, el mRNA es el responsable de la mayor parte de la actividad transcripcional en muchas células, incluso aunque represente sólo una pequeña fracción del contenido total de RNA. La tasa de intercambio normalmente se mide en términos de *vida media* de una molécula que es el tiempo necesario para que se degraden un 50% de las moléculas presentes en un momento dado. Las moléculas de mRNA de células bacterianas normalmente tienen vidas medias de sólo unos pocos minutos, mientras que la vida media de los mRNA eucariotas oscila entre varias horas y unos pocos días.

Ya que la velocidad de degradación de un determinado mRNA determina el tiempo que está disponible para la traducción, las alteraciones en la vida media del mRNA pueden afectar a la cantidad de proteína que se producirá. Como se verá en el Capítulo 23, la regulación de la vida media del mRNA es uno de los mecanismos de control de las células sobre la expresión génica.

La existencia de mRNA permite la amplificación de la información genética

Dado que las moléculas de mRNA se pueden sintetizar «de novo» a partir del mismo segmento de DNA molde, las células tienen la importante oportunidad de *amplificar* el mensaje genético. Si las secuencias de DNA se usaran directamente para la síntesis de proteínas, el número de moléculas de proteína que se podría traducir a partir de cualquier gen, en un determinado periodo de tiempo, estaría limitado estrictamente por la velocidad de síntesis del polipéptido. Pero en un sistema en el que se usa mRNA como intermediario, se pueden producir muchas copias del contenido de un gen, y cada una de ellas puede usarse para sintetizar una proteína.

Como ejemplo muy espectacular de este efecto amplificador, considere la síntesis de fibroína, la proteína principal de la seda. El genoma haploide del gusano de seda tiene sólo una copia del gen de la fibroína, pero se transcriben unas 10^4 copias del mRNA de la fibroína a partir de las dos copias del gen presentes en cada célula diploide de la glándula de la seda. Cada una de estas moléculas de mRNA permite la síntesis de unas 10^5 moléculas de fibroína, lo que da lugar a 10^9 moléculas de fibroína por célula —¡y todo esto durante los 4 días que tarda el gusano en hacer el capullo!—. Sin el mRNA como intermediario, el genoma del gusano de seda necesitaría 10^4 copias del gen de la fibroína (¡o unos 40.000 días!) para hacer un capullo.

La mayoría de los genes que codifican proteínas se encuentran en una sola o unas pocas copias por genoma haploide. Por el contrario, los genes que codifican rRNA y tRNA siempre están presentes en múltiples copias. Es ventajoso para las células tener muchas copias de genes cuyos productos finales son RNA (en lugar de proteínas) porque en este caso no existe la posibilidad de amplificar cada gen repitiendo la traducción.

Perspectiva

La expresión de la información genética es una de las actividades fundamentales de todas las células. Las instrucciones almacenadas en el DNA son primero transcritas y procesadas en moléculas de mRNA, rRNA y tRNA. Estos RNAs tienen después funciones específicas en la síntesis de proteínas, siendo la secuencia de nucleótidos del mRNA la que proporciona la información que realmente determina el orden de los aminoácidos en la cadena polipeptídica. La secuencia de mRNA se lee en codones que son tripletes de nucleótidos. El código genético especifica qué aminoácido corresponde a cada codón. El código no presenta ambigüedades, no es solapante, es degenerado y casi universal.

La transcripción es la síntesis de RNA por un mecanismo que depende del apareamiento de bases complementarias entre los nucleótidos que se van incorporando y los de la hebra molde de DNA. El proceso de transcripción se puede dividir en cuatro fases: (1) unión de la RNA polimerasa a la hebra molde de DNA en la región promotora; (2) iniciación de la síntesis de RNA; (3) elongación de la cadena de RNA; y (4) terminación. Las células procariotas tienen sólo un tipo de RNA polimerasa pero las células eucariotas tienen varios tipos, que utilizan para la síntesis de distintos tipos de RNA. Las secuencias promotoras de DNA que usan las tres RNA polimerasas nucleares son distintas y, a diferencia de lo que sucede en las bacterias, el reconocimiento de los promotores eucariotas es posible, en primer lugar, gracias a factores de transcripción que están separados de la RNA polimerasa. Las interacciones proteína-proteína son, por lo tanto, más importantes para la transcripción eucariota que para este proceso en los procariotas.

Una vez sintetizados, la mayoría de los tránscritos de RNA deben ser procesados para generar moléculas funcionales de RNA. El mRNA procariota es la principal excepción; suele traducirse tal y como es sintetizado. El procesamiento del RNA puede implicar el corte de unidades transcripcionales de más de un gen, la eliminación de secuencias no codificantes, la adición de componentes estructurales especiales, y la inserción, eliminación o modificación química de nucleótidos concretos. El procesamiento del pre-mRNA eucariota es especialmente elaborado. Implica la adición de un casquete en 5′, una cola de poli(A) en 3′ y la eliminación de intrones por el mecanismo de ayuste. El ayuste de la mayoría de los pre-mRNA eucariotas es llevado a cabo por los espliceosomas, que están formados por RNA y proteína; en algunos otros casos, el ayuste está catalizado por intrones de RNA. La presencia de intrones y exones permite que cada pre-mRNA sufra el proceso de ayuste de más de una forma, permitiendo así que un solo gen pueda producir conjuntos de RNA que codifican distintos polipéptidos. En algunos casos, la secuencia de bases del RNA está alterada por el proceso de edición del RNA, que puede generar mRNA que codifican polipéptidos cuya secuencia de aminoácidos no habrá sido predicha en base a la secuencia del gen correspondiente.

Problemas

Los problemas de mayor dificultad están marcados con un •.

21.1 Los códigos y la codificación. Una forma de imaginarse el código genético es comparándolo con el Código Morse Internacional, un sistema de puntos, rayas y espacios usado para enviar mensajes por telégrafo y por radio de onda corta. En el código Morse, cada letra del alfabeto está representada por una única combinación de dos, tres o cuatro puntos y rayas. Por ejemplo, · – (punto, raya) representa la letra A, – · · · (raya, punto, punto, punto) representa la letra B, · – · (punto, raya, punto) representa la letra C y así hasta el cuarto. En base a esta información y en lo que sabe sobre el código genético, explique cómo se relaciona cada uno de los siguientes términos con la codificación e indique con una M si es cierto para el sistema Morse, con una G si se aplica al código genético y con ambas letras si es aplicable a ambos códigos.

(a) Degenerado.

(b) No ambiguo.

(c) Triplete.

(d) Universal.

(e) No solapante.

21.2 El código genético en un fago T. Se encontró que un fragmento de un polipéptido producido por el fago T4 tenía la siguiente secuencia de aminoácidos:

…Lys-Ser-Pro-Ser-Leu-Asn-Ala…

La deleción de un solo nucleótido en un sitio de la hebra molde del DNA de T4 y una inserción de un nucleótido distinto en un sitio próximo cambió la secuencia a:

…Lys-Val-His-His-Leu-Met-Ala…

(a) ¿Cuál es la secuencia de nucleótidos del fragmento de mRNA que codifica este fragmento en el polipéptido original?

(b) ¿Cuál es la secuencia de nucleótidos del mRNA que codifica el fragmento en el mutante?

(c) ¿Podría determinar qué nucleótidos se han insertado y delecionado? Explique su respuesta.

21.3 Mutaciones de cambio de marco de lectura. Los mutantes enunciados tienen una forma mutante distinta del gen que codifica la proteína X. Cada gen mutante contiene una o más inserciones de nucleótidos (+) o deleciones (−) del tipo de las que causa la tinción con acridina. Asuma que todas las mutaciones están muy cerca del principio del gen X. Indique en cada caso con un OK si esperaría que la proteína mutante fuese aproximadamente normal y con un No OK si esperaría que la proteína generada fuese anormal.

(a) −

(b) −/+

(c) −/−

(d) +/−/+

(e) +/−/+/−

(f) +/+/+

(g) +/+/−/+

(h) −/−/+/−/−

(i) −/−/−/−/−/−

•21.4 Vivir con código solapante. Imagínese que el código genético de todas las formas de vida del planeta QB9 constase de tripletes de nucleótidos solapantes, de manera que el aparato de traducción se moviese un solo nucleótido cada vez. Así, la secuencia ABCDEF se leería en la Tierra como dos codones (ABC, DEF) pero en QB9 como cuatro codones (ABC, BCD, CDE, DEF) y el inicio de dos tripletes más. Para cada uno de los siguientes tipos de mutaciones, describa brevemente el efecto que tendría sobre la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada en la Tierra (i) o en QB9 (ii). (Asuma que la mutación se da aproximadamente en la mitad del gen.)

(a) Sustitución de un nucléotido.

(b) Deleción de un nucleótido.

(c) Deleción de tres nucleótidos sucesivos.

•21.5 Localizando promotores. La siguiente tabla recoge datos de los efectos de varias deleciones de genes 5SRNA sobre la capacidad estos genes para ser transcritos por la RNA polimerasa III.

Nucleótidos delecionados	Capacidad del gen 5SRNA para ser transcrito por la RNA polimerasa III
−45 a −1	Sí
+1 a +47	Sí
+10 a +47	Sí
+10 a +63	No
+80 a +123	No
+83 a +123	Sí

(a) ¿Qué le sugiere estos datos sobre la probable localización del promotor de este gen 5SRNA?

(b) Si se realizaran experimentos similares con el gen transcrito por la RNA polimerasa I, ¿qué resultados esperaría?

(c) Si se realizaran experimentos similares con el gen transcrito por la RNA polimerasa II, ¿qué resultados esperaría?

21.6 RNA polimerasas y promotores. Para cada una de las siguientes afirmaciones sobre las RNA polimerasas, indique con una B si la afirmación es verdadera para la enzima bacteriana y con un I, II o III si es cierta para las respectivas polimerasas eucariotas. Cada afirmación puede ser verdadera para una, varias o ninguna de estas enzimas.

(a) La enzima es sensible a la α-amanitina.

(b) La enzima cataliza una reacción exergónica.

(c) Todos los tránscritos primarios deben procesarse antes de ser utilizados en la traducción.

(d) La enzima puede encontrarse a veces unida a una molécula de RNA que tiene también unidas enzimas.

(e) La enzima sintetiza rRNA.

(f) Los factores de transcripción deben unirse al promotor antes de que pueda unirse la polimerasa.

(g) La enzima incorpora una secuencia de poli(A) al mRNA.

(h) La enzima se mueve a lo largo de la hebra molde de DNA en dirección $3' \longrightarrow 5'$.

(i) La enzima sintetiza un producto al que probablemente se incorporará un casquete en 5′.

(j) Todos los promotores usados por la enzima se unen principalmente corriente arriba del punto de inicio transcripcional y sólo se transcriben parcialmente.

(k) La especificidad enzimática de la transcripción está determinada por una subunidad de la holoenzima.

21.7 Procesamiento del RNA. Los tres tipos principales de RNA del citoplasma de una célula típica eucariota son rRNA, tRNA y mRNA. Para cada uno, indique lo siguiente:

(a) Dos o más tipos de procesamiento a los que probablemente esté sujeto cada tipo de RNA.

(b) Una actividad única en el procesamiento de cada RNA.

(c) Una actividad del procesamiento que esperaría encontrar en las mismos tipos de RNA de una célula bacteriana.

•**21.8 Espliceosomas.** El procesamiento del RNA llevado a cabo por los espliceosomas del núcleo eucariota implica a distintos tipos de proteínas y moléculas de RNA. Para cada uno de los siguientes componentes del proceso de ayuste, indique si se trata de una proteína (P), RNA (A) o ambos (PA). Después explique brevemente cómo participa cada uno de los componentes en el proceso.

(a) RNAsn.

(b) Espliceosoma.

(c) RNPsn.

(d) Sitios de corte y empalme.

(e) Lazo.

•**21.9 Antibióticos inhibidores de la transcripción.** La rifamicina y la actinomicina D son dos antibióticos derivados de la bacteria *Streptomyces.* La rifamicina se une a la subunidad β de la RNA polimerasa de *E.coli* e interfiere en la formación del primer enlace fosfodiéster de la cadena de RNA. La actinomicina D se une al DNA de doble cadena por intercalación (se dispone entre pares de bases adyacentes).

(a) ¿A cuál de las cuatro fases de la transcripción esperaría que afectase en primer lugar la rifamicina?

(b) ¿A cuál de las cuatro fases de la transcripción esperaría que afectase en primer lugar la actinomicina D?

(c) ¿Cuál de estos dos antibióticos afectaría más probablemente a la síntesis de RNA en células hepáticas humanas en cultivo?

(d) ¿Cuál de los dos inhibidores sería más útil para un experimento en el que es necesario bloquear la iniciación de nuevas cadenas de RNA sin interferir en la elongación de las cadenas que ya están siendo sintetizadas?

•**21.10 Análisis de copolímeros.** En los intentos iniciales de determinar las asignaciones de los codones, Nirenberg y Matthei usaron primero homopolímeros de RNA y después copolímeros de RNA sintetizados por la enzima polinucleótido fosforilasa. Esta enzima añade nucleótidos al azar sobre la cadena que se está sintetizando pero en proporción a su presencia en la mezcla de incubación. Variando la proporción de precusores de la síntesis de copolímeros, Nirenberg y Matthei pudieron deducir la composición de bases (pero normalmente no la secuencia real) de los codones que codifican parte de los aminoácidos. Imagine que está haciendo dos incubaciones con la polinucleótido fosforilasa, con UTP y CTP en ambos casos, pero en distintas proporciones. En la incubación A, los precusores están presentes a concentraciones equimolares; en la incubación B, hay tres veces más UTP que CTP. Los copolímeros generados en ambas mezclas se usaron después en un sistema de síntesis de proteínas *in vitro* y se analizó la secuencia de los polipéptidos resultantes.

(a) ¿Cuáles son los ocho posibles codones representados por las secuencias de nucleótidos de los copolímeros resultantes en ambas mezclas de incubación? ¿Qué aminoácidos codifican estos codones?

(b) Para cada 64 codones del copolímero formado en la incubación A, ¿qué promedio de cada uno de los ocho posibles codones esperaría? ¿Y en la incubación B?

(c) ¿Qué puede decir sobre la frecuencia esperada de los posibles aminoácidos de los polímeros obtenidos por traducción de los copolímeros de la incubación A? ¿Y sobre los que se producen por la traducción en la incubación B?

(d) Explique qué información se puede obtener de estos experimentos.

(e) ¿Es posible determinar por esta técnica, con 2 U's y 1 C los codones de fenilalanina, leucina y serina? ¿Por qué?

(f) ¿Es posible determinar por esta técnica cuál de los tres codones con 2 U's y 1 C (UUC; UCU, CUU) corresponde a cada uno de los tres aminoácidos mencionados en la parte e? ¿Por qué?

(g) Sugiera una forma de asignar los tres codones del apartado f a los aminoácidos adecuados del apartado e.

•**21.11 Intrones.** Para estudiar la posible presencia de intrones en tres nuevos genes («X», «Y» y «Z») ha diseñado un experimento en el que la enzima de restricción HaeIII se usa para cortar el DNA de cada gen o el DNAc producido a partir del mRNA mediante la transcriptasa inversa. Los fragmentos de DNA resultantes se separan por electroforesis y la presencia de los fragmentos en el gel se detecta por hibridación con una sonda de DNA radiactiva hecha por copia del gen original mediante la DNA polimerasa en presencia de sustratos radiactivos. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Fuente de DNA	Número de fragmentos después de la electroforesis
DNA del gen «X»	3
DNAc procedente del mRNA «X»	2
DNA del gen «Y»	4
DNAc procedente del mRNA «Y»	2
DNA del gen «Z»	2
DNAc procedente del mRNA «Z»	2

(a) ¿Qué podría decir sobre el número de intrones presentes en el gen «X»?

(b) ¿Qué podría decir sobre el número de intrones presentes en el gen «Y»?

(c) ¿Qué podría decir sobre el número de intrones presentes en el gen «Z»?

Bibliografía recomendada

Las referencias con importancia histórica están marcadas con •.

Flujo de información y el código genético

Atkins, J. F. y R. Gesteland. The 22nd amino acid. *Science* 296 (2002): 1409.

•Crick, F. H. C. The genetic code. *Sci. Amer.* 207 (octubre de 1962): 66.

•Crick, F. H. C. The genetic code III. *Sci. Amer.* 215 (octubre de 1966): 55.

Freeland, S. J. y L. D. Hurst. Evolution encoded. *Sci. Amer.* 290 (April 2004): 84.

Kazazian, H. H., Jr. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303 (2004): 1626.

•Nirenberg, M. W. The genetic code II. *Sci. Amer.* 208 (March 1963): 80.

Nirenberg, M. Historical review: deciphering the genetic code—a personal account. *Trends Biochem. Sci.* 29 (2004): 46.

•Sarkar, S. Forty years under the central dogma. *Trends Biochem. Sci.* 23 (1998): 312.

Transcripción en procariotas

Das, A. Control of transcription termination by RNA-binding proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 62 (1993): 893.

Gelles, J. y R. Landick. RNA polymerase as a molecular motor. *Cell* 93 (1998): 13.

Landick, R. Shifting RNA polymerase into overdrive. *Science* 284 (1999): 598.

Nudler, E., A. Goldfarb y M. Kashlev. Discontinuous mechanism of transcription elongation. *Science* 265 (1994): 793.

Young, B. A., T. M. Gruber y C. A. Gross. Views of transcription initiation. *Cell* 109 (2002): 417.

Transcripción en eucariotas

Cramer, P. *et al.* Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science* 288 (2000): 640.

Roeder, R. G. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* 21 (1996): 327.

Shilatifard, A., R. C. Conaway y J. W. Conaway. The RNA polymerase II elongation complex. *Annu. Rev. Biochem.* 72 (2003): 693.

Smale, S. T. y J. T. Kadonaga. The RNA polymerase II core promoter. *Annu. Rev. Biochem.* 72 (2003): 449.

Thomas, M. J., A. A. Platas y D. K. Hawley. Transcriptional fidelity and proofreading by RNA polymerase II. *Cell* 93 (1998): 627.

Tjian, R. Molecular machines that control genes. *Sci. Amer.* 272 (February 1995): 54.

White, R. J. *Gene Transcription: Mechanisms and Control.* Oxford: Blackwell Science, 2001.

Procesamiento del RNA

Kiss, T. Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell* 109 (2002): 145.

Lafontaine, D. L. J. y D. Tollervey. Birth of the snoRNPs: The evolution of the modification-guide snoRNAs. *Trends Biochem. Sci.* 23 (1998): 383.

Patel, A. A. y J. A. Steitz. Splicing double: insights from the second spliceosome. *Nature Reviews Mol. Cell. Biol.* 4 (2003): 960.

Proudfoot, N. J., A. Furger y M. J. Dye. Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* 108 (2002): 501.

Samuel, C. E., et al. RNA editing minireview series. *J. Biol. Chem.* 278 (2003): 1389.

Scherrer, K. Historical review: The discovery of 'giant' RNA and RNA processing: 40 years of enigma. *Trends Biochem. Sci.* 28 (2003): 566.

Steitz, J. A. Snurps. *Sci. Amer.* 258 (June 1988): 58.

Valadkhan, S. y J. L. Manley. Splicing-related catalysis by protein-free snRNAs. *Nature* 413 (2001): 701.

22

Expresión génica: II. Síntesis y clasificación de proteínas

En el capítulo anterior, describimos el flujo de información génica del DNA al ARN, centrándonos en la transcripción del DNA y en el procesamiento de los tránscritos de RNA resultantes. En los genes que codifican RNA ribosómico y RNA de transferencia (y algunos, otras moléculas pequeñas de RNA), el RNA es la última expresión del gen. Pero en miles de genes del genoma de un organismo, el último producto es una proteína. Este capítulo describe cómo el RNA mensajero producido por los genes que codifican proteínas, se traduce en polipéptidos, cómo los polipéptidos se hacen proteínas funcionales y cómo las proteínas llegan a los destinos donde llevan a cabo sus funciones.

La traducción, la primera y más importante fase de la síntesis de proteínas, implica un cambio de lenguaje desde la secuencia de nucleótidos de una molécula de mRNA, a la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica. En esencia, el orden secuencial de los nucleótidos del mRNA, leído como codones de tripletes, especifica el orden en el que los aminoácidos entrantes se van incorporando a la cadena polipeptídica que se está sintetizando. Los ribosomas sirven como lugares intracelulares para el proceso de la traducción, mientras que las moléculas de RNA son los agentes que aseguran la inserción de los aminoácidos correctos en cada posición del polipéptido. Empezaremos describiendo el conjunto de componentes de la célula necesarios para llevar a cabo la traducción, antes de examinar en detalle los pasos de este proceso.

Traducción: los componentes

La maquinaria celular para la traducción del mRNA a polipéptidos consta de cinco componentes principales: los ribosomas, que llevan a cabo el proceso de síntesis de polipéptidos, las moléculas de tRNA, que alinean los aminoácidos en el orden correcto a lo largo del molde de mRNA, las *aminoacil-tRNA sintetasas*, que unen los aminoácidos a sus moléculas de tRNA correspondientes, las moléculas de mRNA que llevan codificada la información de la secuencia de aminoácidos para que se sinteticen los polipéptidos, y los *factores proteicos* que facilitan varios pasos del proceso de traducción. Para describir estos componentes, empezaremos con los ribosomas.

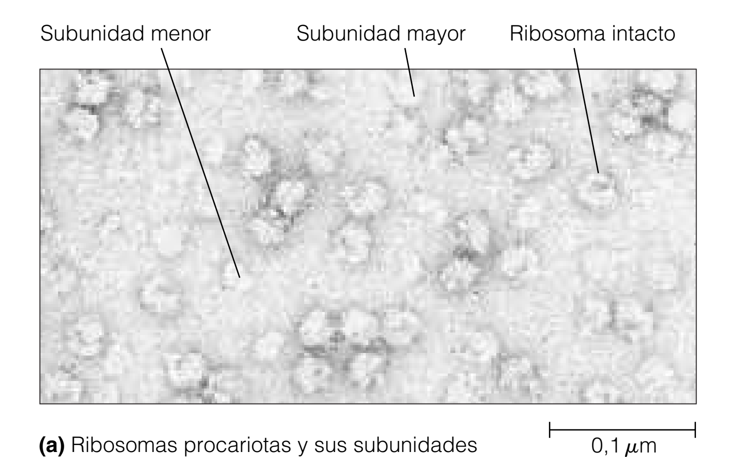
Los ribosomas llevan a cabo la síntesis de polipéptidos

Los ribosomas desempeñan un papel fundamental en la síntesis de proteínas, orientando adecuadamente el mRNA, con respecto a los tRNAs que portan a los aminoácidos, de tal manera que el código genético se lea adecuadamente y catalizando la formación de los enlaces peptídicos que unen los aminoácidos de la cadena polipeptídica. Como vimos en el Capítulo 4, los **ribosomas** son partículas hechas de RNA y proteínas que se encuentran en el citoplasma, tanto de células eucariotas como de procariotas, así como en la matriz mitocondrial y en el estroma de los cloroplastos. En el citoplasma eucariótico se pueden encontrar,

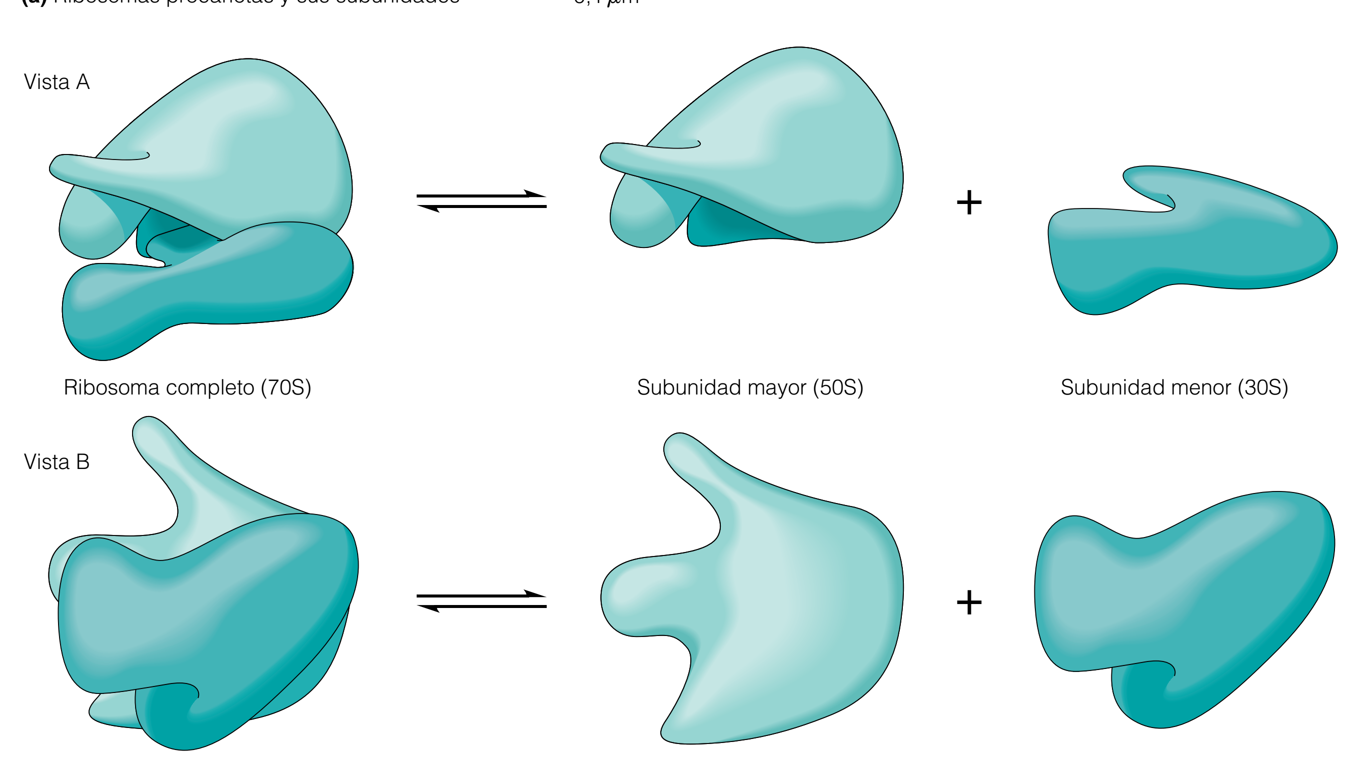
tanto libres en el citosol, como unidos a las membranas del retículo endoplásmico y a la membrana externa de la envuelta nuclear. Los ribosomas de los eucariotas y los procariotas son estructuralmente muy similares, pero no idénticos. Los ribosomas de los procariotas son más pequeños, contienen menos proteínas, tienen moléculas de RNA más pequeñas (y menos RNA) y son sensibles a diferentes inhibidores de la síntesis de proteínas.

En la imagen de microscopía electrónica de la Figura 22.1 se puede ver la forma de los ribosomas de los procariotas. Como todos los ribosomas, consta de dos unidades disociables denominadas *subunidad mayor* y *subunidad menor*. Un ribosoma porcariótico completo, con un coeficiente de sedimentación de unos 70S, consta de una subunidad menor 30S y de una subunidad mayor 50S; su equivalente eucariota es un ribosoma 80S que consta de una subunidad 40S y otra 60S. La Tabla 22.1 recoge algunas propiedades de los ribosomas y de sus subunidades en procariotas y eucariotas. Los RNA ribosómicos y las moléculas de proteínas se autoensamblan en subunidades mayores y menores, pero los dos tipos de subnidades sólo se unen cuando se introduce el mRNA, como veremos brevemente. La cristalografía de rayos X ha permitido recientemente conocer a nivel atómico la organización de todas las proteínas y RNAs de las subunidades menor y mayor de los ribosomas bacterianos.

Funcionalmente, los ribosomas se han llamado a veces «bancos de trabajo» de la síntesis de proteínas, pero su papel activo en la síntesis de polipéptidos hace que «máquina» sea un término más apropiado. En esencia, el papel



(a) Ribosomas procariotas y sus subunidades



(b) Dos vistas del ribosoma procariota y sus subunidades

Figura 22.1 El ribosoma de células procariotas. **a**) Esta micrografía electrónica muestra, tanto los ribosomas completos, como las subunidades (MET). (**b**) Estos modelos están basados en las micrografías. En las dos vistas, el ribosoma se ha rotado 90 grados. El ribosoma procariota tiene unos 25 nm de diámetro. (El ribosoma de eucariotas es aproximadamente de la misma forma y tiene unos 30 nm de diámetro.)

Tabla 22.1 Propiedades de los ribosomas citoplasmáticos en procariotas y eucariotas

Fuente	Tamaño de los ribosomas		Subunidad	Tamaño de subunidad		Proteínas de la subunidad	RNAs de la subunidad	
	Valor S*	Peso molecular		Valor S	Peso molecular		Valor S	Nucleótidos
Células procariotas	70S	$2{,}5 \times 10^6$	Mayor	50S	$1{,}6 \times 10^6$	34	23S	2.900
							5S	120
			Menor	30S	$0{,}9 \times 10^6$	21	16S	1.540
Células eucariotas	80S	$4{,}2 \times 10^6$	Mayor	60S	$2{,}8 \times 10^6$	Unas 46	25-28S	≤4.700
							5.8S	160
							5S	120
			Menor	40S	$1{,}4 \times 10^6$	Unas 32	18S	1.900

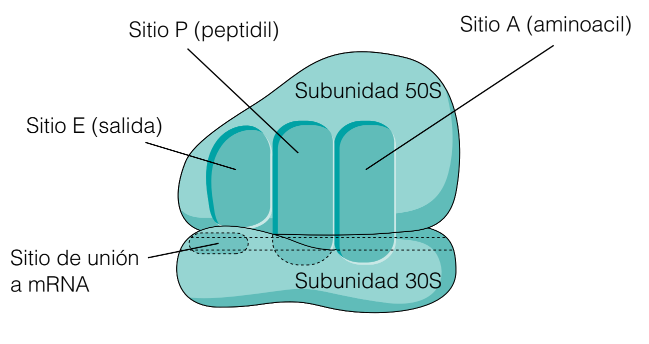
* Si le sorprende que los valores S de las subunidades no sumen el total del ribosoma, recuerde que el valor S es una medida de la velocidad a la que sedimenta una partícula concreta, y sólo se relaciona indirectamente con la masa de la partícula.

del ribosoma en la síntesis de polipéptidos recuerda al de una complicada y gran enzima construida a partir de más de 50 proteínas distintas y varios tipos de rRNAs. Durante muchos años, se pensó que el rRNA proporcionaba simplemente un anclaje estructural para proteínas ribosomales, siendo estas las que, de hecho, llevaban a cabo la síntesis polipeptídica. Pero hoy sabemos que el caso inverso está más próximo a la realidad, el rRNA lleva a cabo muchas de las funciones principales de los ribosomas.

En el ribosoma existen cuatro lugares particularmente importantes para la síntesis de proteínas (Figura 22.2). Son un **sitio** de **unión a mRNA** y tres sitios a los que puede unirse tARN: un **sitio A (aminoacil),** donde se une cada nuevo tRNA, que llega portando un aminoácido, **un sitio P (peptidil)**, donde reside el tRNA que lleva la cadena polipeptídica en formación, y un **sitio E (exit, salida** en inglés), desde el cual los tRNAs abandonan el ribosoma, después de haber descargado sus aminoácidos. El funcionamiento de estos sitios en el proceso de traducción quedará claro seguidamente.

Las moléculas de RNA de transferencia llevan los aminoácidos al ribosoma

Dado que la secuencia de codones del mRNA determina la secuencia de aminoácidos de las cadenas polipeptídicas, debe existir un mecanismo que permita a los codones organizar a los aminoácidos en el orden adecuado. La naturaleza general de este mecanismo fue propuesta por primera vez por Francis Crick. Con una extraordinaria precisión, Crick postuló que los aminoácidos no podían reconocer directamente secuencias de bases de nucleótidos y que por tanto debía existir algún tipo de molécula «adaptadora» hipotética que mediara la interacción entre aminoácidos y mRNA. Además, predijo que cada molécula adaptadora poseería dos sitios, uno de unión a un aminoácido específico y otro que reconocería una secuencia de bases del mRNA, que codificaría este aminoácido.



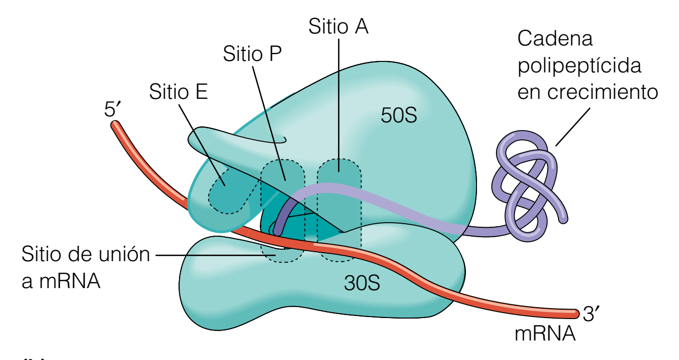


Figura 22.2 Sitios de unión importantes en el ribosoma procariota. Este modelo estructural del ribosoma muestra los sitios A (aminoacil) y P (peptidil) como cavidades del ribosoma donde se unen las moléculas de tRNA cargadas (transportando aminoácidos) durante la síntesis de polipéptidos. El sitio E (salida) es el sitio desde el que abandonan el ribosoma los tRNAs descargados. El sitio de unión a mRNA se une a una secuencia de nucleótidos determinada, cerca del extremo 5′ del mRNA, situándolo en la posición adecuada para la traducción de su primer codón. (**a**) Representación esquemática del ribosoma que se emplea en este capítulo. El par de líneas horizontales punteadas indica dónde queda la molécula de mRNA. (**b**) Una representación más realista. Los sitios de unión están localizados exactamente en la interfase entre las subunidades mayor y menor o cerca de ella.

Al año siguiente de la propuesta de Crick, Mahlon Hoagland descubrió una familia de moléculas adaptadoras que presentaban las propiedades predichas. Mientras investigaba el proceso de síntesis de proteínas en sistemas no celulares, Hoagland encontró, trabajando con aminoácidos radiactivos, que éstos se encontraban primero covalentemente unidos a pequeñas moléculas de ARN. Añadiendo estos complejos aminoácido-ARN a los ribosomas, se inicia el proceso de síntesis de proteínas y la incorporación de aminoácidos radiactivos a las nuevas proteínas. Hoagland concluyó, por lo tanto, que los aminoácidos se encuentran inicialmente unidos a pequeñas moléculas de ARN, que después llevan a los aminoácidos al ribosoma, para su posterior inserción en las cadenas polipeptídicas en formación.

Las moléculas de RNA descubiertas por Hoagland se denominaron ARNs de transferencia (tRNAs). Adecuándose a su papel de intermediarios entre el mRNA y los aminoácidos, las moléculas de tRNA presentan dos tipos de especificidad. Cada tRNA se une a un aminoácido específico y cada uno reconoce uno o más codones de los mRNAs, que especifican el aminoácido particular, según las correspondencias indicadas en el código genético. Los RNAs de tranferencia están unidos a sus aminoácidos correspondientes por un enlace éster que une el aminoácido al grupo 2′- o 3′-hidroxilo del nucleótido de adenina (A), localizado en el extremo 3′ de todas las moléculas de tRNA (Figura 22.3a). La selección del aminoácido correcto para cada tRNA es responsabilidad de las enzimas que catalizan la formación del enlace éster, como veremos brevemente. Por convención, el nombre del aminoácido que se une a un tRNA dado se indica como un superíndice. Por ejemplo, las moléculas de tRNA específicas de la alanina se identifican como $tRNA^{Ala}$. Una vez que está unido el aminoácido, el tRNA se denomina aminoacil tRNA (ej., alanil $tRNA^{Ala}$). Se dice que el tRNA se encuentra *cargado* y que el aminoácido está *activado*.

Las moléculas de RNA de transferencia pueden reconocer codones en el mRNA porque cada tRNA posee un **anticodón**, una secuencia especial de tres nucleótidos localizada dentro de uno de los bucles de la molécula del tRNA (*véase* Figura 22.3a). El anticodón de cada tRNA es complementario a uno o más codones del mRNA que especifica al aminoácido que deber ser transportado por el tRNA. Por lo tanto, *los anticodones permiten a las moléculas de tRNA reconocer codones en el mRNA, por complementariedad de bases.* Tome nota de la convención usada al representar codones y anticodones: los codones del mRNA se escriben en dirección 5′ → 3′, mientras que los anticodones del tRNA suelen representarse en orientación 3′ → 5′. Así, uno de los codones de la alanina es 5′-GCC-3′ y el correspondiente anticodón en el tRNA es 3′-CGG-5′.

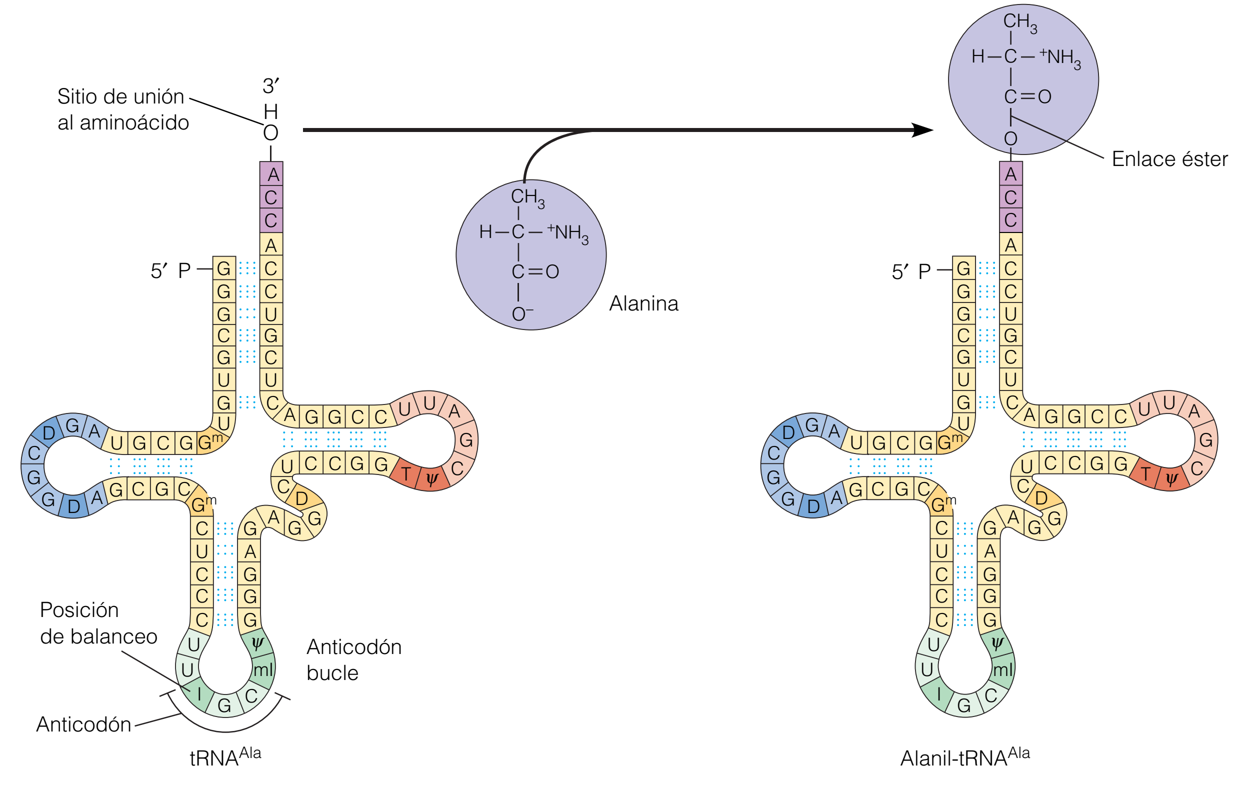
Dado que el código genético emplea 61 codones distintos para especificar los aminoácidos, es de esperar que hubiera 61 moléculas distintas de tRNA implicadas en la síntesis de proteínas, cada una de ellas responsable del reconocimiento de un codón distinto. Sin embargo, el número de tRNAs distintos es significativamente menor de 61, porque muchas moléculas de tRNA reconocen más de un codón. Esto se puede apreciar examinando la tabla del código genético (*véase* Figura 21.8). Los codones que difieren en la tercera base suelen codificar el mismo aminoácido. Por ejemplo, UUU y UUC codifican fenilalanina; UCU, UCC, UCA y UCG codifican serina; y así sucesivamente. En estos casos, el mismo tRNA se une a más de un codón sin introducir errores. Por ejemplo, un mismo tRNA puede reconocer los codones UUU y UUC porque ambos codifican el mismo aminoácido, la fenilalanina.

Estas consideraciones llevaron a Francis Crick a proponer que el mRNA y el tRNA se alinean en el ribosoma, de forma que permiten cierta flexibilidad o «balanceo» en el apareamiento entre la tercera base del codón y la correspondiente base del anticodón. De acuerdo con la **hipótesis del balanceo**, esta flexibilidad en la unión codón-anticodón permite que se formen algunos apareamientos inesperados, como se muestra en la Figura 22.4. La inusual base inosina (I), que es extremadamente rara en otras moléculas de ARN, se presenta a menudo en la posición de balanceo de los anticodones del tRNA (*véase* Figura 22.3a). La inosina es la más «balanceante» de todas las bases de la tercera posición, ya que puede aparear con U, C o A. Por ejemplo, un tRNA con el anticodón 3′-UAI-5′ puede reconocer los codones AUU, AUC y AUA, que codifican el aminoácido isoleucina.

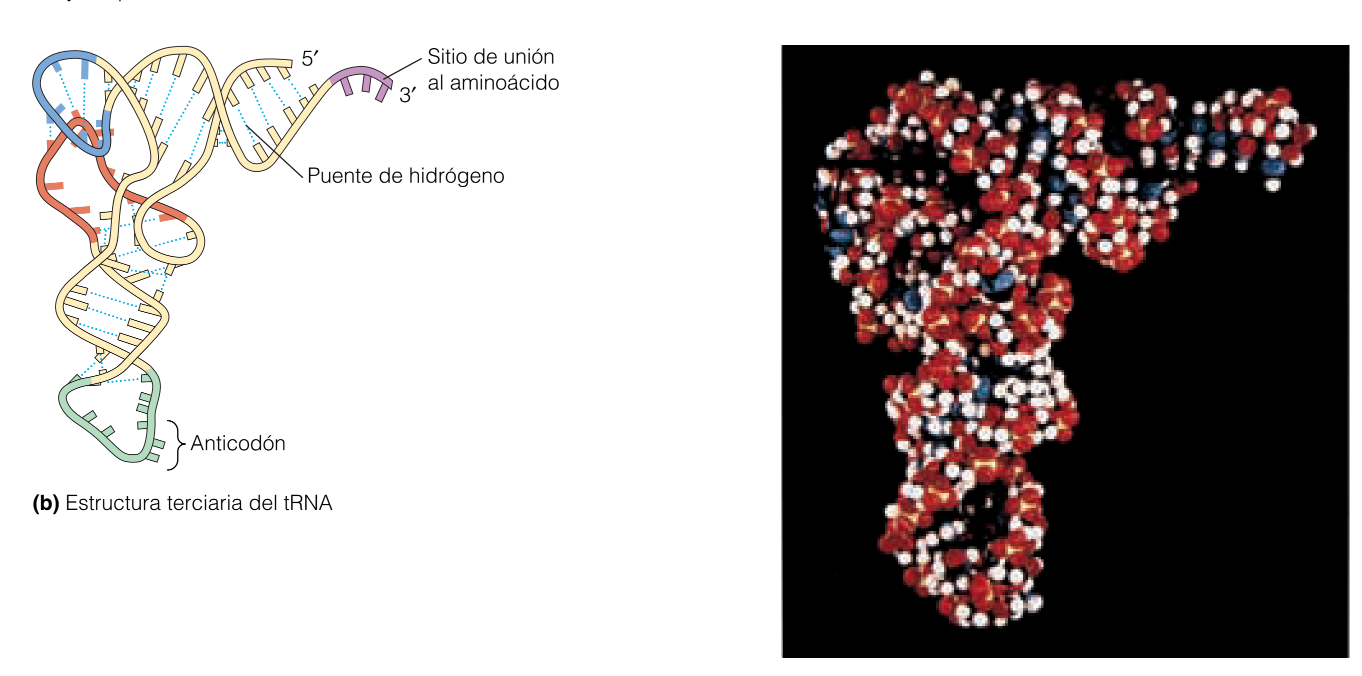
Es por esta posición de balanceo por lo que se requiere, para algunos aminoácidos, un menor número de moléculas de tRNA que el número de codones que especifican dichos aminoácidos. En el caso de la isoleucina, por ejemplo, una célula puede traducir los tres codones con una sola molécula de tRNA que contenga como anticodón 3′-UAI-5′. De la misma manera, los seis codones del aminoácido leucina (UUA, UUG, CUU, CUC, CUA y CUG) requieren sólo tres tRNAs debido al balanceo. Aunque la existencia del balanceo significa que una misma molécula de tRNA puede reconocer más de un codón, los diferentes codones reconocidos por un determinado tRNA siempre codifican el mismo aminoácido, y por lo tanto el balanceo no conduce a la inserción de aminoácidos incorrectos.

Las aminoacil-tRNA sintetasas unen los aminoácidos a los RNAs de transferencia adecuados

Antes de que una molécula de tRNA pueda llevar su aminoácido específico al ribosoma, ese aminoácido debe estar unido covelentemente al tRNA. Las enzimas responsables de la unión de los aminoácidos a sus respectivas moléculas de tRNA se denominan **aminoacil-tRNA sintetasas**. Las células tienen normalmente 20 tipos distintos de aminoacil-tRNA sintetasas, una por cada uno de los 20 aminoácidos más frecuentes para la síntesis de proteínas.

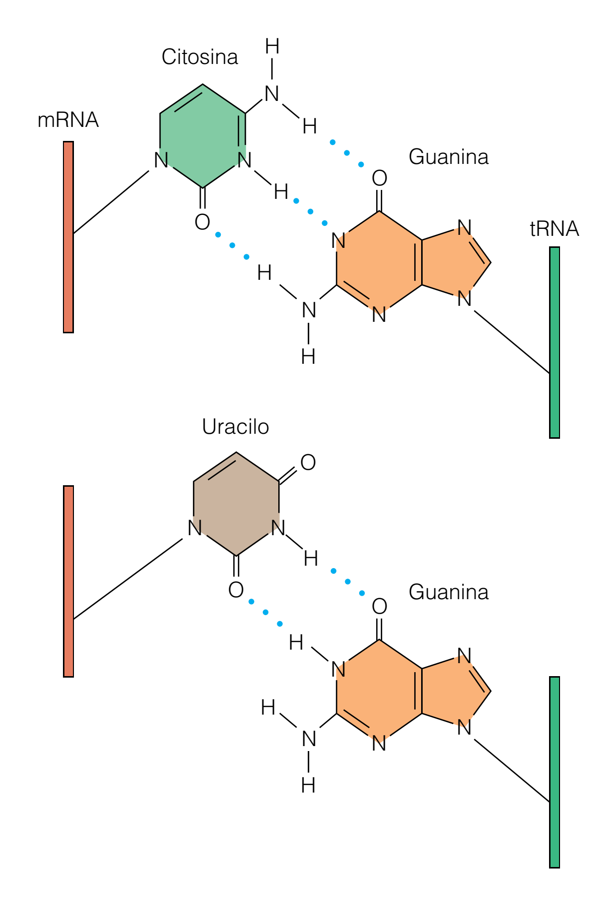


(a) Estructura secundaria del tRNA, antes y después de la unión al aminoácido



(b) Estructura terciaria del tRNA

Figura 22.3 Secuencia, estructura y aminoacilación de un tRNA. (**a**) El tRNA alanina de levadura, como todas las moléculas de tRNA, tiene tres bucles principales, cuatro regiones de apareamiento de bases, un triplete anticodón y una secuencia 3′ terminal de CCA a la que debe unirse el aminoácido adecuado mediante un enlace éster. Las bases modificadas están coloreadas en oscuro y sus nombres (como nucleóxidos) están abreviados: I para inosina, mI para metilinosina, D para dihidrouridina, T para ribotimidina, ψ para pseudouridina y G^m para metilguanosina. (Para entender el significado de la flexibilidad en la tercera base del anticodón, *véase* la Figura 22.4.) (**b**) En la estructura terciaria en forma de L del tRNA, el sitio de unión al aminoácido está en un extremo y el anticodón en el otro. El código de colores de los bucles del tRNA correlaciona las estructuras secundarias (bidimensionales) del apartado **a** con la estructura terciaria (tridimensional) de la parte izquierda del apartado **b**. El modelo de tRNA de la derecha del apartado **b** muestra los átomos individuales. La estructura que aquí se presenta, es característica de todos los tRNAs.



Bases reconocidas en el codón (sólo en la tercera posición)	Base en anticodón
U	A
G	C
A o G	U
C o U	G
U, C o A	I (Inosina)

Figura 22.4 La hipótesis del balanceo. Los dos diagramas ilustran cómo un pequeño desplazamiento en la posición de la base guanina en el anticodón de un tRNA le permitiría aparear con uracilo (debajo) en lugar de con su base complementaria habitual, la citosina (arriba). La tabla resume los apareamientos permitidos en la tercera posición de un codón por la hipótesis del balanceo.

Cuando existe más de un tRNA para un determinado aminoácido, la aminoacil-tRNA sintetasa correspondiente para ese aminoácido reconoce cada uno de los tRNAs. Algunas células presentan menos de 20 aminoacil-tRNA sintetasas. En estos casos, la misma aminoacil-tRNA sintetasa puede catalizar la unión de dos aminoácidos a sus tRNA correspondientes o puede unir un aminoácido incorrecto a una molécula de tRNA. Estos errores son después corregidos por una segunda enzima que altera el aminoácido incorrecto tras su unión al tRNA.

Las aminoacil-tRNA sintetasas catalizan la unión de un aminoácido a su correspondiente tRNA, mediante un enlace éster, en una reacción acoplada a la hidrólisis de ATP en AMP y pirofosfato:

$$\underset{\text{Aminoácido}}{H_3N^+{-}\overset{\displaystyle R}{\overset{|}{C}}H{-}\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}{-}O^-} + HO{-}\boxed{\text{tRNA}} \xrightarrow[\text{Aminoacil-RNAt sintetasa}]{\text{ATP} \quad \text{AMP} + \text{PP}_i} H_3N^+{-}\overset{\displaystyle R}{\overset{|}{C}}H{-}\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}{-}O{-}\boxed{\text{tRNA}}$$

La Figura 22.5 resume los pasos de esta reacción. La hidrólisis del pirofosfato a 2 P_i conduce la reacción.

Se dice que el enlace éster que une el aminoácido al tRNA es un enlace de «alta energía». Esto significa simplemente que la hidrólisis del enlace libera suficiente energía para permitir la formación del enlace peptídico, que posteriormente unirá el aminoácido a la cadena polipeptídica en formación. El proceso de aminoacilación de una molécula de tRNA se denomina, por lo tanto, *activación del aminoácido*, porque no sólo une el aminoácido a su tRNA adecuado, sino que además lo activa para la posterior formación del enlace peptídico.

¿Cómo identifican las aminoacil-tRNA sintetasas el tRNA correcto para cada aminoácido? Las diferencias en las secuencias de bases de las distintas moléculas de tRNA hacen posible distinguirlas y, sorprendentemente, el anticodón no es la única característica reconocible. Los cambios en la secuencia de bases del triplete anticodón o en el extremo 3′ de la molécula de tRNA pueden cambiar el aminoácido al que se une el tRNA. Así, las aminoacil-tRNA sintetasas reconocen nucleótidos localizados en, al menos, dos regiones distintas de las moléculas del tRNA, cuando interaccionan con el tRNA que va a unirse a un aminoácido concreto. Después de unir un aminoácido a la molécula de tRNA, algunas aminoacil-tRNA sintetasas revisan el producto final, para asegurarse de que se ha introducido el aminoácido correcto. Esta actividad correctora es llevada a cabo por un sitio de la aminoacil-tRNA sintetasa, que reconoce aminoácidos erróneos y los libera hidrolizando el enlace de unión al tRNA.

Una vez que se ha unido a su tRNA el aminoácido correcto, es el propio tRNA (y no el aminoácido) el que reconoce el codón apropiado en el mRNA. La primera evidencia de esto la dieron Francois Chapville y Fritz Lipmann, que diseñaron un elegante experimento con el tRNA del aminoácido cisteína. Tomaron el tRNA al que ya se había unido la cisteína y lo trataron con un catalizador de níquel, que convirtió la cisteína en el aminoácido alanina. El resultado fue, por lo tanto, una alanina unida covalentemente a una molécula de tRNA que normalmente transportaba cisteína. Cuando los investigadores añadieron este aminoacil tRNA anormal a un sistema de síntesis de proteínas in vitro, la alanina se insertó en las cadenas polipeptídicas en las localizaciones que normalmente ocupaba la cisteína.

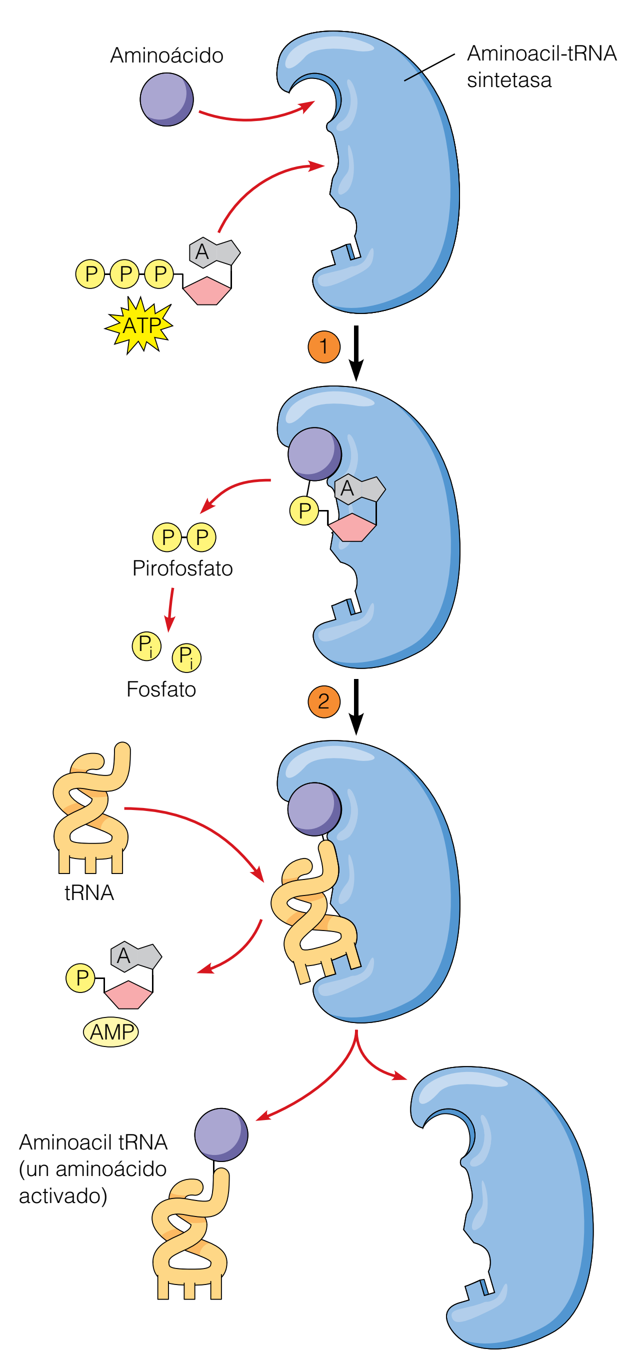


Figura 22.5 Activación de un aminoácido por medio de la aminoacil-tRNA sintetasa. Esta enzima cataliza la formación de un enlace éster entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo 3′OH del tRNA apropiado, en una reacción de dos pasos. ① El aminoácido y una molécula de ATP entran en el sitio activo de la enzima. Simultáneamente, el ATP pierde el pirofosfato, y el AMP resultante se une covalentemente al aminoácido. El pirofosfato es hidrolizado a 2 P_i. ② El tRNA se une covalentemente al aminoácido, desplazando al AMP. El aminoacil tRNA se libera después de la enzima.

Este resultado probó que los codones del mRNA reconocen a las moléculas de tRNA y no a los aminoácidos a los que están unidas. Así, la especificidad de la reacción de la aminoacil-tRNA sintetasa es crucial para la precisión de la expresión génica, porque asegura que a cada tRNA se une el aminoácido adecuado.

El RNA mensajero lleva la información codificada al ribosoma

Como vimos en el Capítulo 21, es la traducción de los codones del mRNA la que determina el orden en el que los aminoácidos se unen durante la síntesis de proteínas. Así, es el mRNA que se une a un determinado ribosoma el que determina qué polipéptido generará el ribosoma. El núcleo del RNA mensajero es, por supuesto, su mensaje —la secuencia de núcleotidos que codifican el polipéptido—. Sin embargo, una molécula de mRNA tiene también secuencias en ambos extremos que no son traducidas, como se muestra en la Figura 22.6. La secuencia no traducida en el extremo 5′ del mRNA precede al **codón de iniciación**, que es el primer codón en ser transcrito. El codón de iniciación suele ser AUG, aunque algunos otros tripletes se usan ocasionalmente como codones de iniciación en algunos virus y eucariotas. La secuencia no traducida del extremo 3′es la que sigue al **codón stop**, que es el último codón que se traduce y que puede ser UAG, UAA o UGA. Las regiones 5′y 3′no traducidas presentan longitudes de entre unas docenas y cientos de núcleotidos. Aunque estas secuencias no se traducen, su presencia es esencial para una traducción adecuada del mRNA. Las regiones no traducidas de los mRNA eucariotas incluyen un casquete en 5′y una cola de poli(A), como vimos en el Capítulo 21.

En los eucariotas, cada molécula de mRNA codifica normalmente un solo polipéptido. En los procariotas, sin embargo, algunos mRNAs son *policistrónicos*; esto significa que codifican varios polipéptidos, normalmente con funciones relacionadas en la célula. Los conjuntos de genes que dan lugar a moléculas de mRNA policistrónicos son unidades transcripcionales sencillas denominadas operones, que veremos en el Capítulo 23 durante el estudio de la regulación génica. Las regiones que codifican proteínas de los mRNAs policistrónicos suelen estar separadas entre sí por regiones espaciadoras.

Se requieren factores proteicos para la iniciación, elongación y terminación de las cadenas polipeptídicas

Además de las aminoacil-tRNA sintetasas y los componentes proteicos de los ribosomas, la traducción requiere de la participación de otros tipos de proteínas. Algunos de estos *factores proteicos* son necesarios para la iniciación de la traducción, otros para la elongación de la cadena polipeptídica en formación, y otros para la terminación de la síntesis de polipéptidos. Las funciones concretas de estos factores se expondrán a continuación, cuando expliquemos el mecanismo de traducción.

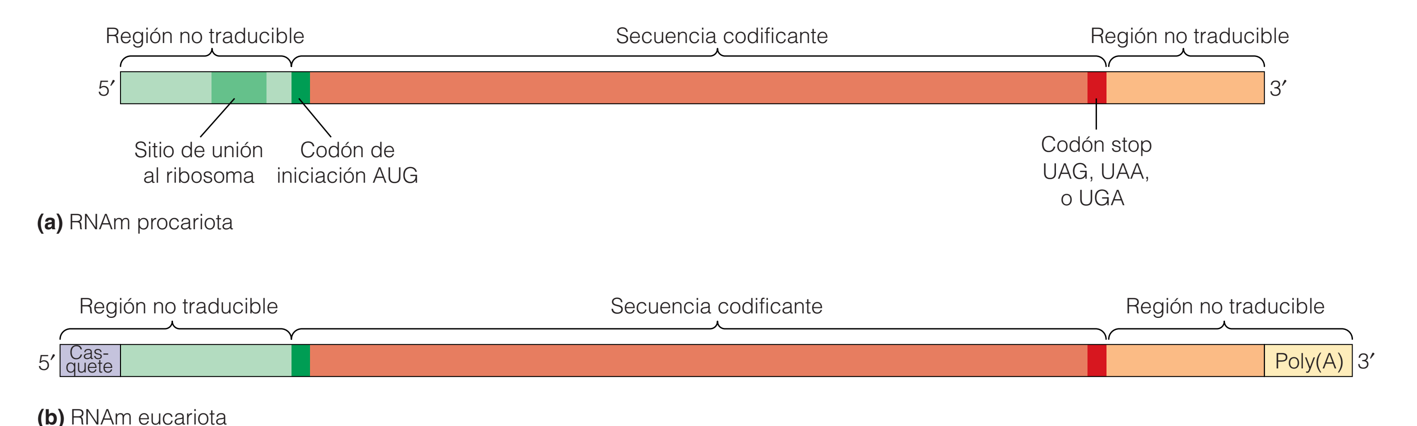


Figura 22.6 **RNA mensajero.** (**a**) Una molécula de mRNA que codifica un solo polipéptido tiene las características mostradas. (Un mRNA procariota poligénico tendría generalmente estas características en cada gen.) (**b**) Una molécula de mRNA eucariota tiene, además, un casquete en 5′ y una cola de poli(A) en 3′. Además, no presenta el sito de unión al ribosoma (una secuencia de nucleótidos denominada también secuencia Shine-Dalgarno, por sus descubridores).

El mecanismo de traducción

La traducción de los mRNAs a polipéptidos es un proceso secuencial y ordenado que comienza con la síntesis de una cadena polipeptídica por el extremo amino terminal, o N-terminal, y continúa con la adición de aminoácidos a la cadena en crecimiento, hasta que se llega al extremo carboxilo terminal, o C-terminal. La primera evidencia experimental de un mecanismo de traducción se dio en 1961 de la mano de Howard Dintzis, que investigaba la síntesis de la hemoglobina en los eritrocitos en desarrollo, que se habían incubado brevemente con aminoácidos radiactivos. Dintzis pensó que si el tiempo de incubación con un radioisótopo es relativamente breve, la radiactividad presente en las cadenas de hemoglobina completas debería concentrarse en el extremo de la última molécula sintetizada. Encontró que las concentraciones más altas de radiactividad en las cadenas de hemoglobina completas estaba en el extremo C-terminal, lo que indicaba que el extremo C-terminal es lo último que se sintetiza de la cadena polipeptídica. Esto le permitió concluir que durante la traducción del mRNA, *los aminoácidos se van añadiendo a la cadena polipeptídica en crecimiento, empezando por el extremo N-terminal y continuando hacia el extremo C-terminal.*

En teoría, el mRNA podría leerse tanto en dirección 5′ → 3′como en dirección 3′ → 5′. El primer intento de determinar la dirección real de lectura implicó el uso de moléculas de RNA artificiales. Un ejemplo típico es el RNA sintético que se puede hacer añadiendo la base C al extremo 3′ de poli(A), dando lugar a la molécula 5′- AAAAAAAAA...AAC-3′. Cuando se añade a un sistema de síntesis de proteínas in vitro, este RNA estimula la síntesis de un polipéptido que consta de un conjunto de residuos de lisina con una asparagina en el extremo C-terminal. Dado que AAA codifica lisina y AAC codifica asparagina, esto significa que *el mRNA se traduce en dirección 5′ → 3′.* Algunas evidencias que lo confirmaron vinieron de numerosos estudios en los que las secuencias de mRNA se comparaban con las secuencias de aminoácidos de las cadenas polipeptídicas que los codificaban. En todos los casos, la secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica correspondía al orden de los codones del mRNA leídos en dirección 5′ → 3′.

Para comprender cómo la traducción del mRNA en dirección 5′ → 3′ conduce a la síntesis de polipéptidos en la dirección del extremo N-terminal al extremo C-terminal, es útil subdividir el proceso de traducción en tres fases, como se muestra en la Figura 22.7: ① La fase de *iniciación*, en la que el mRNA se une al ribosoma y se posiciona para la traducción; ② la fase de *elongación*, en la que los aminoácidos se van uniendo secuencialmente por medio de enlaces peptídicos en el orden determinado por la ordenación de codones del mRNA; y ③ Una fase de *terminación*, en la que el mRNA y la nueva cadena polipeptídica se desligan del ribosoma.

En las siguientes secciones, examinaremos detalladamente cada una de estas fases. Nuestra exposición se centrará principalmente en la traducción en células procariotas, donde los mecanismos son especialmente bien conocidos; los procesos equivalentes en eucariotas son bastantes similares. Los aspectos de la traducción que son exclusivos de procariotas o eucariotas se encuentran fundamentalmente en la fase de iniciación, como veremos en la siguiente sección.

La iniciación de la traducción requiere factores de iniciación, subunidades ribosómicas, mRNA y tRNA iniciador

Iniciación en procariotas. En la Figura 22.8 se representa la iniciación de la traducción en procariotas, donde se aprecia que la iniciación se puede subdividir en tres pasos

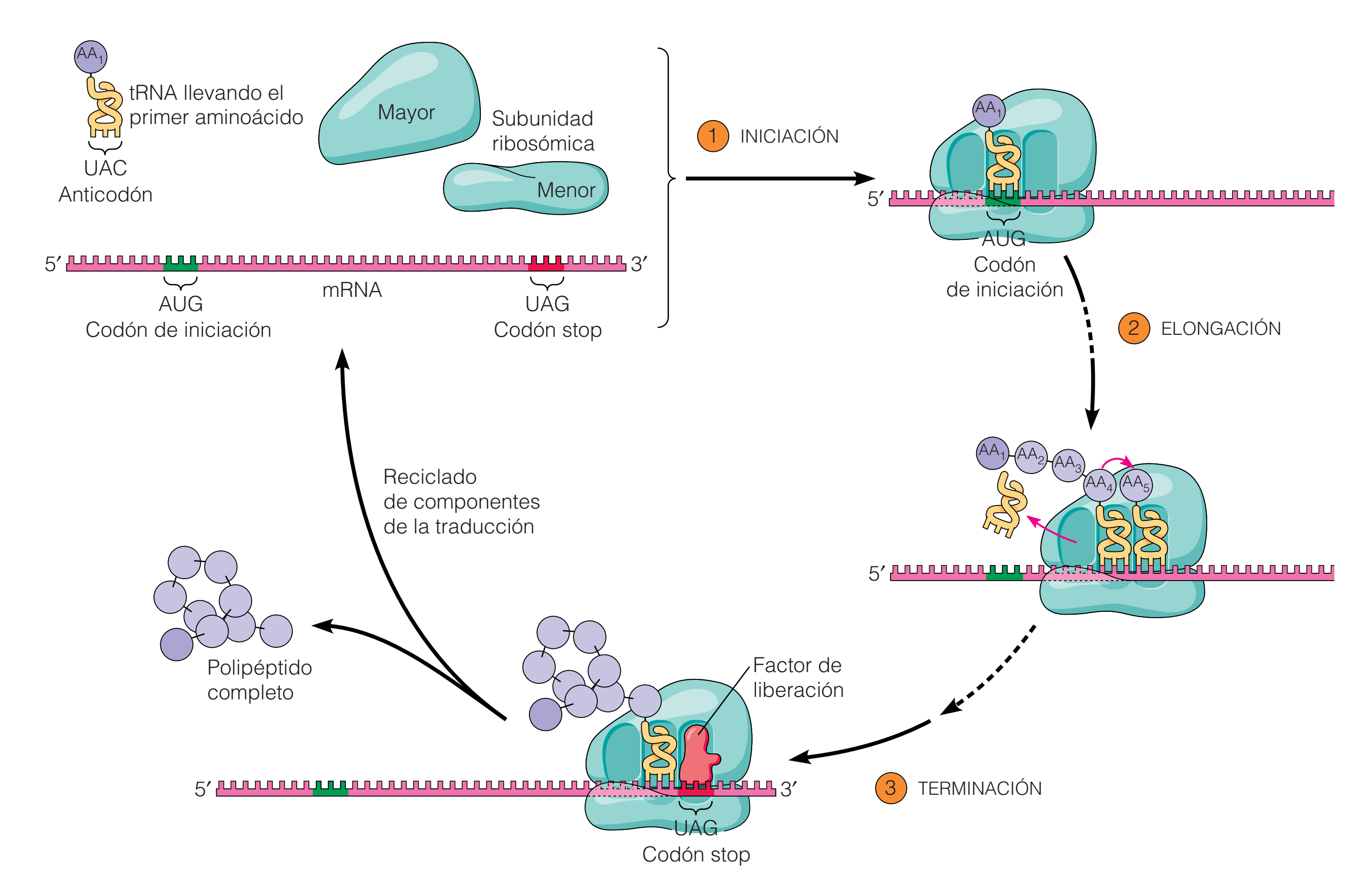


Figura 22.7 **Una visión general de la traducción.** La traducción se da en tres fases. ① En la iniciación, los componentes del aparato de traducción se unen a la molécula de mRNA . Un tRNA que lleva el primer aminoácido (AA_1), se une al codón de iniciación. ② En la elongación, los aminoácidos son transportados hasta el mRNA por los tRNAs y se van añadiendo, uno a uno, a la cadena polipeptídica en formación. ③ En la terminación, un codón stop del mRNA es reconocido por un factor de liberación proteico, y el aparato de la traducción queda aparte, liberando la cadena polipeptídica completa.

distintos. En el paso ①, los tres **factores de iniciación** —denominados *IF1, IF2* e *IF3*— se unen a la subunidad ribosómica menor, con el GTP unido a IF2.

En el paso ② de la Figura 22.8, el mRNA y el tRNA que lleva el primer aminoácido se unen a la subunidad ribosómica 30S. El mRNA se une a la subunidad 30S en la orientación adecuada por medio de una secuencia de nucleótidos especial denominada *sitio de unión del mRNA al ribosoma* (conocida también como secuencia *Shine-Dalgarno*, por sus descubridores). Esta secuencia consta de un conjunto de 3-9 nucleótidos de purina (a menudo AGGA) localizados ligeramente por delante del codón de iniciación. Estas purinas del mRNA aparean con una secuencia rica en pirimidinas del extremo 3′del rRNA 16S, que forma el *sitio de unión a mRNA del ribosoma.* Se ha puesto de manifiesto la importancia del sitio de unión a mRNA por medio de estudios con *colicinas*, que son proteínas producidas por ciertas cepas de *Escherichia coli*, que pueden matar a otros tipos de bacterias. Una de estas proteínas, la colicina E3, mata bacterias anulando su capacidad de síntesis de proteínas. Después de la entrada en el citoplasma de las bacterias susceptibles, la colicina E3 cataliza la eliminación de un fragmento de 49 nucleótidos del extremo 3′del rRNA 16S, destruyendo el sitio de unión al mRNA y por lo tanto, generando ribosomas que ya no pueden iniciar la síntesis proteica.

La unión del mRNA a su sitio de unión en la subunidad ribosómica menor, sitúa el codón AUG de iniciación del mRNA en el sitio P del ribosoma, desde donde se puede unir al anticodón del tRNA adecuado. El primer indicio de que hay un tipo especial de tRNA implicado en este paso fue el descubrimiento de que aproximadamente la mitad de las proteínas de *E.coli* contienen metionina en su extremo N-terminal. Esto resultaba sorprendente porque la metionina es un aminoácido relativamente poco común, que representa un porcentaje pequeño de los aminoácidos presentes en las proteínas bacterianas. La explicación de esta observación provino del descubrimiento de que las células bacterianas contienen dos tipos de tRNA específicos de metionina. Uno, denominado $tRNA^{Met}$, lleva la metionina normal, destinada a la inserción del aminoácido en regiones internas de las cadenas polipeptídicas. El otro,

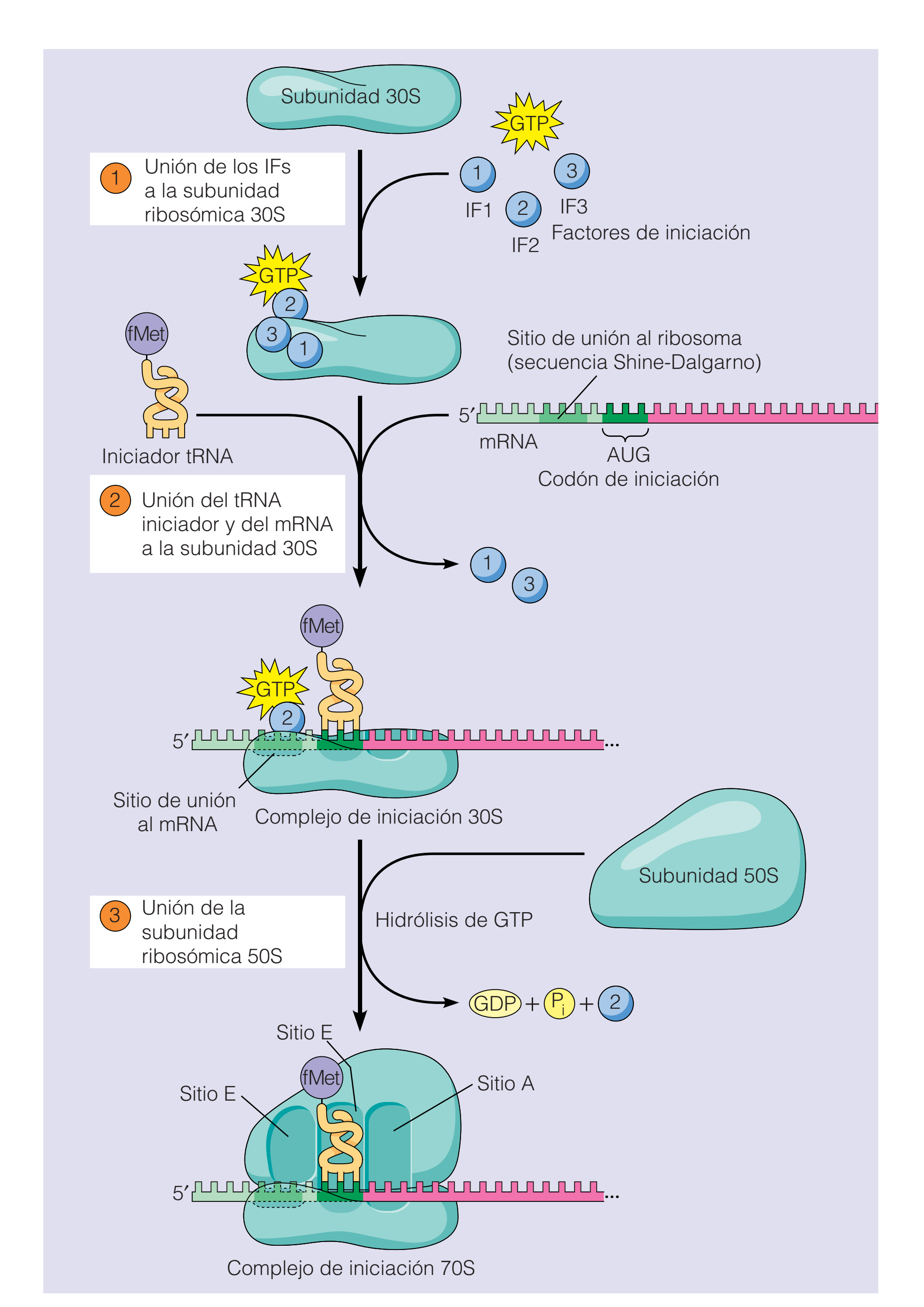


Figura 22.8 Iniciación de la traducción en procariotas. La formación del complejo de iniciación 70S tiene lugar en tres pasos. ① Tres factores de iniciación (IF) y GTP se unen a la subunidad ribosómica menor. ② El aminoacil tRNA iniciador y el mRNA se unen. El sitio de unión a mRNA está compuesto, al menos en parte, por una porción del rRNA 16S de la subunidad menor. ③ La subunidad ribosomal mayor se une al complejo. El complejo de iniciación 70S resultante tiene fMet-tRNA^{fMet} en el sitio P del ribosoma.

denominado tRNA^{fMet} lleva una metionina que se convierte en el derivado *N-formilmetionina (fMet)* después de la unión al tRNA (Figura 22.9). En la N-formilmetionina, el grupo amino de la metionina está bloqueado por la adición de un grupo formilo y por lo tanto no puede formar un enlace peptídico con otro aminoácido; sólo está disponible el grupo carboxilo para unirse a otro aminoácido. Por lo tanto, la N-formilmetionina sólo puede situarse en el extremo amino terminal de la cadena polipeptídica, lo que sugiere que el tRNA^{fMet} funciona como **un iniciador de tRNA** que inicia el proceso de traducción. Esta idea fue

Grupo formilo: H–C=O

$CH_3-S-CH_2-CH_2-CH(NH-CHO)-COO^-$

Figura 22.9 Estructura de la N-formilmetionina. La N-formilmetionina (fMet) es el aminoácido modificado con el que se inicia la síntesis de todos los polipéptidos en procariotas.

confirmada por el descubrimiento de que las cadenas polipeptídicas en los primeros estadios de la síntesis contienen siempre N-formilmetionina en su extremo N-terminal. Cuando se ha completado la cadena polipeptídica (y en algunos casos mientras todavía se está sintetizando), el grupo formilo, y a menudo la propia metionina, son eliminados enzimáticamente.

Durante la iniciación, el tRNA iniciador con su N-formilmetionina se une al sitio P de la subunidad ribosómica 30S por la acción del factor de iniciación IF2 (unido a GTP), que puede distinguir al $tRNA^{fMet}$ de otros tipos de tRNAs. Esta propiedad del IF2 ayuda a explicar por qué los codones AUG de iniciación se unen al $tRNA^{fMet}$ iniciador mientras que los codones AUG localizados en otro sitio del mRNA se unen al $tRNA^{Met}$ no iniciador. Una vez que el $tRNA^{fMet}$ entra en el sitio P, su anticodón aparea con el codón de iniciación AUG del mRNA, y se liberan IF1 e IF3. El complejo formado por la subunidad 30S con el GTP-IF2, el mRNA y la N-formilmetionil $tRNA^{fMet}$, se conoce como **complejo de iniciación 30S.**

Por último, en el paso ③ de la Figura 22.8, el complejo de iniciación 30S se une a una subunidad ribosómica 50S libre, generando el **complejo de iniciación 70S**. La unión de la subunidad 50S se produce gracias a la hidrólisis del GTP asociado a IF2, que se da cuando IF2 abandona el ribosoma. En esta fase, los tres factores de iniciación han sido liberados.

Iniciación en eucariotas. El proceso de iniciación en eucariotas requiere un conjunto diferente de factores de iniciación (denominados eIFs), una ruta algo distinta de ensamblaje del complejo de iniciación y un iniciador especial $tRNA^{Met}$ que —como el tRNA normal de la metionina, pero a diferencia del tRNA iniciador en procariotas— lleva una metionina que no ha sido previamente formilada. El factor de iniciación eIF2, con el GTP ya unido, se une al iniciador metionil $tRNA^{Met}$; posteriormente este tRNA se une a la subunidad menor del ribosoma, junto con otros factores de iniciación. El complejo resultante se une después al extremo 5′ de un mRNA, reconociendo el casquete 5′(en algunas situaciones el complejo puede unirse a un *sitio interno de unión al ribosoma* o IRES, que se encuentra por encima del codón de iniciación en ciertos tipos de mRNA , incluyendo mRNAs virales). Después de la unión a un mRNA, la subunidad menor del ribosoma, con el tRNA iniciador ya unido, rastrea a lo largo del mRNA y normalmente empieza la traducción en el primer triplete AUG que encuentra. Los nucleótidos situados a ambos lados del codón de iniciación eucariota, parecen estar implicados en el reconocimiento; *ACCAUGG* (denominada también secuencia Kozac) es una secuencia de iniciación común, en la que el triplete subrayado es el codón de iniciación. Cuando el $tRNA^{Met}$ iniciador aparea con el codón de iniciación, la subunidad ribosómica mayor se une al complejo.

La elongación de la cadena implica ciclos secuenciales de unión del aminoacil tRNA, formación del enlace peptídico y traslocación

Una vez formado el complejo de iniciación, se sintetiza una cadena polipeptídica por adiciones sucesivas de aminoácidos, de acuerdo con la secuencia de codones del mRNA. Como se especifica en la Figura 22.10, esta etapa de elongación de la síntesis del polipéptido implica un ciclo repetitivo de tres pasos en el que ① la *unión de un aminoacil tRNA* lleva un nuevo aminoácido a la posición de unión a la cadena polipeptídica, ② la *formación del enlace peptídico* une el aminoácido a la cadena polipeptídica en formación, y ③ se produce un desplazamiento del mRNA de tres nucleótidos mediante el proceso de *traslocación* para llevar al siguiente codón a la posición correcta para la traducción. Cada uno de estos pasos se describirá más detalladamente en los siguientes párrafos.

Unión del aminoacil tRNA. Al principio de la etapa de elongación, el codón de iniciación AUG del mRNA está localizado en el sitio P del ribosoma y el segundo codón (el codón inmediatamente por debajo del codón de iniciación) está localizado en el sitio A. La elongación empieza cuando un aminoacil tRNA cuyo codón es complementario al segundo codón se une al sitio A del ribosoma (*véase* la Figura 22.10, ①). La unión de este nuevo aminoacil tRNA al codón del sitio A requiere dos **factores de elongación** proteicos, *EF-Tu* y *EF-Ts*, y está mediada por la hidrólisis de GTP. A partir de este momento, todos los nuevos aminoácidos que se van incorporando se unen primero al sitio A (aminoacil), de ahí el nombre de este sitio.

La función de EF-Tu, con su GTP unido, es transportar el aminoacil tRNA al sitio A del ribosoma. El complejo EF-Tu-GTP promueve la unión de todos los aminoacil tRNA al ribosoma, excepto el tRNA *iniciador*; así se asegura, por lo tanto, que los codones AUG localizados por debajo del codón de iniciación no recluten erróneamente hacia el ribosoma a un tRNA iniciador. Durante la transferencia del aminoacil tRNA al ribosoma, se hidroliza GTP y se libera el complejo EF-Tu-GDP. La función de EF-Ts es regenerar EF-Tu-GTP a partir de EF-Tu-GDP para el siguiente ciclo de elongación (*véase* Figura 22.10, ①).

Los factores de elongación no reconocen anticodones concretos, lo que significa que cualquier tipo de aminoacil tRNA (distinto del tRNA de iniciación) puede ser transportado hacia el ribosoma. Sin embargo, algunos mecanismos deben asegurar que en el ribosoma sólo se retiene el aminoacil tRNA correcto para su utilización, durante la formación del enlace peptídico. Si el anticodón de un nuevo aminoacil tRNA no es complementario del codón expuesto en el sitio A, el aminoacil tRNA no se une al ribosoma lo suficiente como para que pueda producirse la hidrólisis de GTP. Cuando el ajuste es casi correcto pero no exacto, puede darse una unión transitoria y se hidroliza

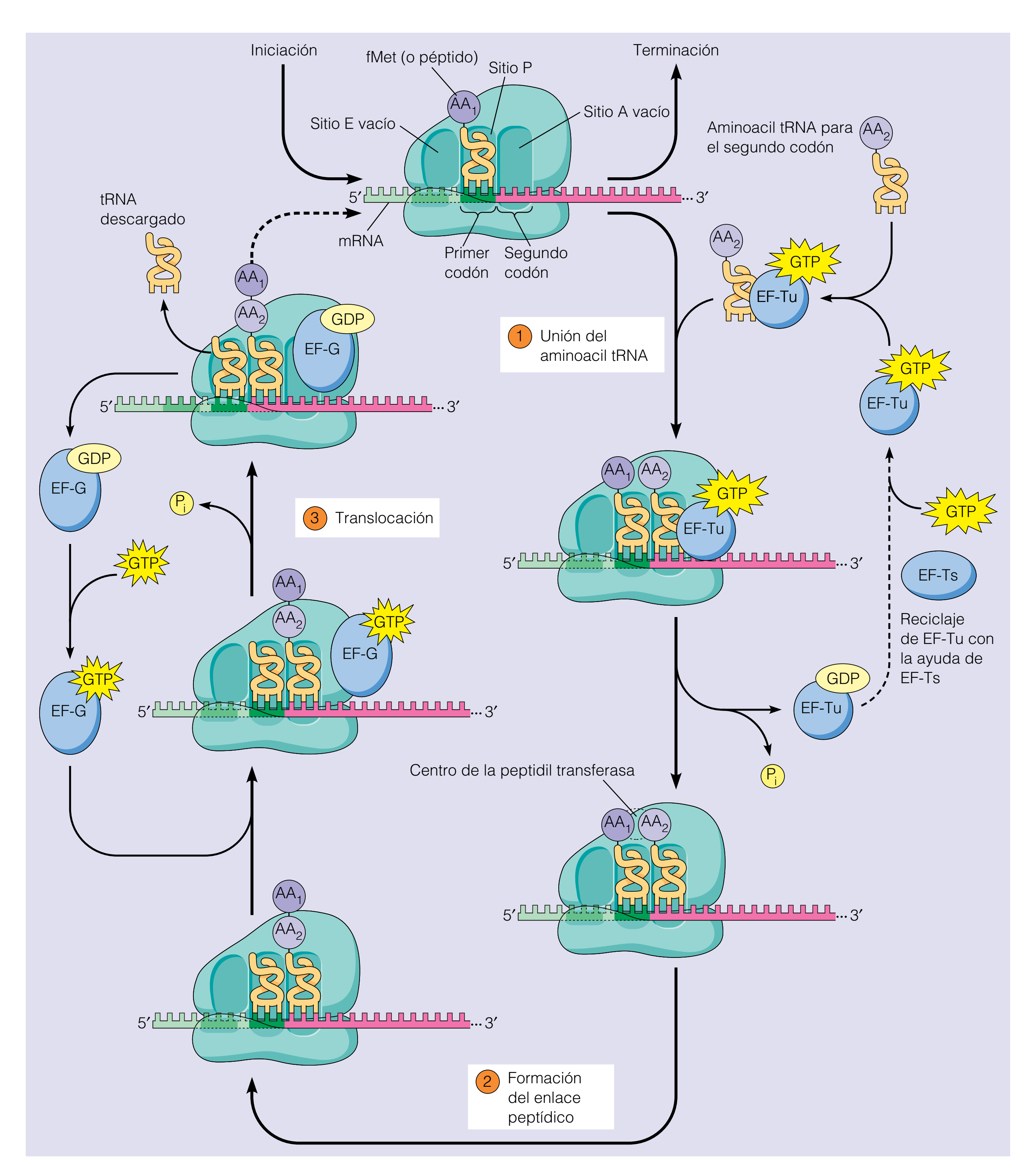


Figura 22.10 Elongación de la cadena polipeptídica en procariotas. La elongación de la cadena durante la síntesis de proteínas requiere la presencia de un peptidil tRNA o, en el primer ciclo de elongación (como se muestra aquí), un fMet-tRNA^{fMet} en el sitio peptidil (P). ① La elongación empieza con la unión del segundo aminoacil tRNA al sitio aminoacil (A) del ribosoma. El tRNA es transportado al sitio A por el factor de enlongación EF-Tu, que también lleva unido GTP. Cuando el tRNA se une se produce la hidrólisis de GTP y se libera EF-Tu. EF-Ts facilita el reciclaje de EF-Tu. ② Se forma un enlace peptídico entre el grupo carboxilo de la fMet (o, en un ciclo posterior, del aminoácido terminal) del sitio P y el grupo amino del nuevo aminoácido situado en el sitio A. Esta reacción está catalizada por la actividad peptidil transferasa de la molécula de rRNA 23S de la subunidad mayor del ribosoma. ③ Tras la unión del EF-G-GTP al ribosoma, se hidroliza el GTP y el tRNA que lleva el polipéptido elongado se trasloca del sitio A al P. El tRNA descargado se desplaza del sitio P al sitio E (salida) y deja el ribosoma. La traslocación del peptidil tRNA desplaza también al mRNA. En consecuencia, el siguiente codón del mRNA se desplaza al sitio A, que está abierto para el siguiente aminoacil tRNA. Este ciclo se repite cada vez que se añade un nuevo aminoácido.

GTP. Si embargo, los desapareamientos entre el anticodón del aminoacil tRNA y el codón del mRNA generan una estructura anormal del sitio A que normalmente es detectada por el ribosoma, lo que supone un rechazo a la unión del aminoacil tRNA. Estos mecanismos de selección contra aminoacil tRNA incorrectos, junto con la capacidad de corrección de errores de las aminoacil tRNA sintetasas descrita anteriormente, hacen que la tasa final de error en la traducción no sea normalmente mayor de 1 aminoácido incorrecto por cada 10.000 incorporaciones.

Formación del enlace peptídico. Tras la incorporación del aminoacil tRNA adecuado en el sitio A del ribosoma, el siguiente paso es la formación de un enlace peptídico entre el grupo amino del aminoácido unido al sitio A y el grupo carboxilo por el que el aminoácido inicial (o la cadena polipeptídica en formación) se encuentra unido al tRNA del sitio P. La formación de este enlace peptídico hace que la cadena polipeptídica en formación sea transferida del tRNA localizado en el sitio P al tRNA del sitio A (*véase* Figura 22.10, ②). La formación del enlace peptídico es el único paso en la síntesis de proteínas que no requiere ni factores proteicos no ribosómicos ni una fuente externa de energía como el GTP o el ATP. La energía necesaria procede de la ruptura del enlace de alta energía que une el aminoácido o la cadena polipeptídica al tRNA localizado en el sitio P.

Durante muchos años se pensó que la formación del enlace peptídico estaba catalizada por una hipotética proteína ribosómica a la que se daba el nombre de **peptidil transferasa.** Sin embargo, en 1992 Harry Soller y sus colegas mostraron que la subunidad mayor de los ribosomas bacterianos retenía la actividad peptidil transferasa después de haber eliminado todas las proteínas ribosómicas. Sin embargo, esta actividad peptidil transferasa desaparece rápidamente cuando el rRNA se degrada por exposición de los ribosomas a ribonucleasas. Estas observaciones sugerían que era el rRNA en lugar de las proteínas ribosómicas el responsable de la catálisis de la formación del enlace peptídico. En los ribosomas bacterianos, la actividad peptidil transferasa se ha localizado en el rRNA 23S de la subunidad mayor del ribosoma, y los datos estructurales de alta resolución obtenidos por rayos X señalan como sitio catalítico a un átomo de nitrógeno situado en un nucleótido de adenina concreto de la cadena de ARN. Así, el rRNA 23S es un ejemplo de *ribozima*, una enzima compuesta sólo por RNA (*véase* Capítulo 6, página 161).

Traslocación. Después de la formación del enlace peptídico, el sitio P contiene un tRNA vacío, mientras que el sitio A contiene un peptidil tRNA (el RNA al que se encuentra unida la cadena polipeptídica). El mRNA avanza entonces una distancia de tres nucleótidos respecto a la subunidad menor, llevando el siguiente codón a la posición adecuada para la traducción. Durante este proceso de **traslocación**, el peptidil tRNA se desplaza del sitio P al sitio E (salida), donde se libera del ribosoma (*véase* Figura 22.10, ③). El proceso de traslocación requiere que un factor de elongación, denominado *ER-G* y una molécula de GTP, se asocien transitoriamente al ribosoma. La energía para la traslocación procede de la hidrólisis de este GTP.

Durante la traslocación, el peptidil tRNA permanece unido mediante un puente de hidrógeno al mRNA, mientras el mRNA avanza tres nucleótidos. El papel fundamental del peptidil tRNA en el proceso de traslocación se demostró usando moléculas de tRNA mutantes con anticodones de cuatro nucleótidos. Estos tRNAs se unen mediante puentes de hidrógeno a cuatro nucleótidos del mRNA y cuando se produce la traslocación, el mRNA avanza cuatro nucléotidos en lugar de los tres habituales. Pero aunque esta observación indica que el tamaño del bucle del anticodón del peptidil tRNA unido al sitio A determina cúanto avanza el mRNA durante la traslocación, no está clara la base física del mecanismo que transloca realmente el mRNA sobre la superficie del ribosoma.

El efecto neto de la traslocación es el desplazamiento del mRNA al sitio A, de manera que el ribosoma está de nuevo listo para recibir el siguiente aminoacil tRNA y repetir el ciclo de elongación. La única diferencia entre los sucesivos ciclos de elongación y el primer ciclo es que un tRNA de iniciación ocupa el sitio P al principio del primer ciclo de elongación y es un peptidil tRNA el que lo ocupa al principio de los siguientes ciclos. A medida que se añade un nuevo aminoácido, el mRNA se va leyendo progresivamente en dirección $5' \rightarrow 3'$. El extremo amino terminal de la cadena polipeptídica en crecimiento sale del ribosoma a través de un *canal de salida* situado en la subunidad 50S, y la cadena empieza a plegarse generalmente según sale de este túnel. La síntesis de los polipéptidos es muy rápida; en una célula de *E.coli* en crecimiento, un polipéptido de 400 aminoácidos puede sintetizarse en ¡10 segundos!

La terminación de la síntesis polipeptídica está mediada por factores de liberación que reconocen codones stop

El proceso de elongación representado en la Figura 22.10 continúa de forma cíclica, leyéndose un codón tras otro y añadiendo sucesivos aminoácidos a la cadena polipeptídica, hasta que uno de los tres posibles codones stop (UAG, UAA o UGA) del mRNA llega al sitio A del ribosoma (Figura 22.11). A diferencia de lo que sucede con otros codones, no hay moléculas de tRNA que reconozcan codones stop. Estos codones stop son, sin embargo, reconocidos por proteínas denominadas **factores de liberación**, que mimetizan la estructura molecular de las moléculas de tRNA, que llevando GTP, se unen al sitio A del ribosoma y finalizan la traducción, puesto que separan a la cadena polipeptídica completa del peptidil tRNA. El corte es hidrolítico; el polipéptido se transfiere a una molécula de agua en lugar de a un aminoácido activado, quedando un grupo carboxi-

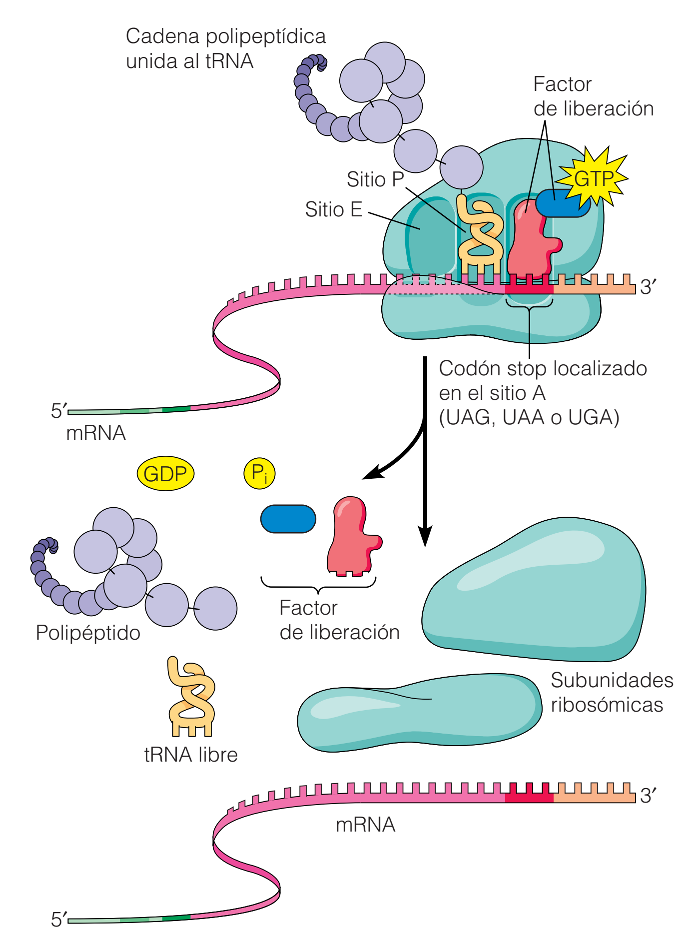


Figura 22.11 Terminación de la traducción. Cuando un codón stop —UAG, UAA o UGA— llega al sitio A, es reconocido por factores de liberación asociados a GTP, que se asocian a estos codones. La hidrólisis de GTP se asocia a la liberación del polipéptido completo, seguido de la disociación del tRNA, mRNA, subunidades ribosómicas y factores de liberación.

lo libre al final de la cadena polipeptídica, que es su extremo C-terminal. Al mismo tiempo que el polipéptido se libera por la hidrólisis de GTP, los otros componentes del complejo ribosómico se separan. Ahora están de nuevo disponibles para su reutilización en un nuevo complejo de iniciación.

El plegamiento del polipéptido está facilitado por chaperonas moleculares

Para que los polipéptidos sintetizados «de novo» puedan llevar a cabo sus funciones biológicas, deben plegarse para adquirir la conformación tridimensional adecuada. Los polipéptidos suelen empezar a plegarse en sus estructuras secundaria y terciaria cuando todavía están siendo sintetizados. Como vimos en los Capítulos 2 y 3, la estructura primaria de una proteína es suficiente para determinar su estructura tridimensional, y de hecho muchos polipéptidos se pueden plegar espontáneamente en sus conformaciones adecuadas en un tubo de ensayo. Sin embargo, el plegamiento de las proteínas dentro de las células está normalmente facilitado por proteínas denominadas **chaperonas moleculares** (*véase* pág. 32). De hecho, el plegamiento adecuado de algunas proteínas requiere la acción de varias chaperonas distintas que actúan en diferentes fases del proceso de plegamiento, empezando por el momento en que la cadena polipeptídica empieza a salir del ribosoma. Una de las funciones primarias de las chaperonas es unirse a las cadenas polipeptídicas durante las primeras etapas del plegamiento, evitando así que interaccionen con otros polipéptidos antes de haber adquirido su conformación adecuada. Cuando se producen fallos en el plegamiento, las proteínas mal plegadas pueden ser destruidas o, en algunos casos, reparadas con la ayuda de las chaperonas. Sin embargo, algunos tipos de cadenas polipeptídicas incompletas o incorrectamente plegadas tienden a unirse entre sí, formando agregados insolubles que se depositan en el interior de las células o entre ellas. Estos depósitos proteicos desencadenan alteraciones en las funciones celulares y pueden incluso dar lugar a degeneración tisular y muerte celular. El Anexo 22A describe cómo estos sucesos contribuyen al desarrollo de enfermedades como el Alzheimer o el «mal de las vacas locas».

Se han encontrado chaperonas en todo tipo de organismos vivos, desde bacterias a orgánulos de células eucariotas. Dos de las familias de chaperonas más frecuentes se denominan Hsp70 y Hsp60. (El «Hsp» procede de la designación inicial de estas proteínas como «heat shock proteins» —proteínas de choque térmico— porque se producen en bacterias sujetas a condiciones de estrés como la exposición a una elevada temperatura; en estas condiciones, las chaperonas facilitan el replegamiento de las proteínas dañadas por el calor). Las dos familias de chaperonas operan mediante mecanismos algo distintos, pero ambas tienen actividad ATPasa y funcionan uniendo y liberando cíclicamente a sus proteínas sustrato, con el concurso de ATP. Es la liberación de la proteína lo que requiere la hidrólisis de ATP. En los últimos años se ha confirmado que las chaperonas están implicadas en otras actividades además del plegamiento; veremos un ejemplo relacionado con el transporte de proteínas más adelante, en este mismo capítulo.

La síntesis de proteínas suele utilizar una fracción importante de las reservas energéticas celulares

La elongación de las cadenas polipeptídicas implica la hidrólisis de, al menos, cuatro enlaces fosfoanhídrido de alta energía, por cada aminoácido añadido. Dos de estos enlaces los proporciona el ATP que se hidroliza a AMP durante la reacción de la aminoacil-tRNA sintetasa. Los restantes los aportan dos moléculas de GTP: una que se utiliza en la unión del aminoacil tRNA al sitio A, y la otra en el paso de traslocación. Asumiendo que cada enlace fosfoanhídrido

Enfermedades asociadas al plegamiento de proteínas

Antes de desarrollar sus funciones, las cadenas polipeptídicas deben plegarse adecuadamente. Se han encontrado más de una docena de enfermedades humanas asociadas a defectos en el proceso de plegamiento. Entre las mejor conocidas está la enfermedad de Alzheimer, una disfunción mental que afecta a uno de cada diez americanos de más de 65 años. Los síntomas del Alzheimer se asocian con, al menos, dos tipos de anomalías —agregados intracelulares de una forma polimérica de una proteína asociada a los microtúbulos, denominada tau, y placas amiláceas extracelulares que contienen fibras de una pequeña proteína llamada *β-amilácea* (Aβ). La evidencia de que Aβ podría ser la causa primaria del Alzheimer surgió a principios de los años 90, cuando se descubrió que algunas formas hereditarias de Alzheimer están causadas por mutaciones en el precusor de una proteína de la membrana plasmática, denominada APP, cuyo procesamiento da lugar a Aβ. El mutante APP da lugar a una forma desplegada de Aβ que se agrega en largas fibras, creando placas amiláceas que se acumulan en el cerebro causando pérdida de la función mental por daño en las neuronas próximas a las placas.

Aunque esta evidencia genética pone de manifiesto la importancia de las placas amiláceas, la mayoría de los individuos que desarrollan Alzheimer no presentan mutaciones en el precusor APP y por lo tanto producen la versión normal de Aβ. La moléculas normales de Aβ son solubles y por lo tanto inofensivas en la mayoría de los individuos, pero en algunas personas, estas mismas moléculas Aβ se agregan en fibras que se acumulan formando las placas amiláceas. Aunque la razón de este comportamiento no está clara, el descubrimiento de que las personas que tienen distintas formas de una proteína denominada *apolipoproteína E (apoE)* tienen distinto riesgo de padecer la enfermedad, aportó alguna pista. ApoE funciona fundamentalmente como transportador de colesterol, pero una pequeña cantidad se encuentra asociada a las placas amiláceas en los espacios interneuronales. El mecanismo por el que apoE ejerce su efecto en la enfermedad de Alzheimer no está claro, pero se han propuesto dos posibilidades. Una es que apoE facilite directamente la formación de las placas amiláceas en los espacios entre las células nerviosas interfiriendo en el plegamiento adecuado de Aβ o en su eliminación del espacio intercelular. La otra posibilidad es que apoE libere colesterol en las membranas de las células nerviosas, produciendo un medio rico en colesterol que facilita el procesamiento de APP en Aβ. Esta idea está apoyada por el descubrimiento de que las enzimas implicadas en la conversión de APP en Aβ se encuentran en regiones de la membrana plasmática ricas en colesterol.

Esperemos que la mejora del conocimiento de la relación entre las placas amiláceas y el Alzheimer conduzca al desarrollo de tratamientos eficaces. Se ha visto en animales de experimentación que la formación de placas amiláceas se reduce con tratamientos tales como: (a) inhibidores enzimáticos que bloquean el procesamiento de APP para dar Aβ, (b) antibióticos que disuelven las placas amiláceas o previenen su formación o (c) vacunas que contienen Aβ y estimulan el sistema inmune para eliminar las placas o prevenir los depósitos de Aβ. Estas vacunas pueden incluso proteger a los ratones de la pérdida de memoria, lo que hace que se pueda albergar la esperanza de acabar con esta devastadora enfermedad en un futuro no muy lejano.

Las anomalías en el plegamiento de proteínas también son la base de un conjunto de enfermedades degenerativas que incluyen el «scrapie» en las ovejas y la «*enfermedad de las vacas locas*» en el ganado bovino. Stanley Prusiner, que recibió el Premio Nobel en 1997 por ser pionero en los trabajos de este campo, propuso que estas enfermedades podían ser transmitidas por partículas proteicas infecciosas denominadas **priones** (se describen brevemente en el Capítulo 4). Dado que los priones no parecen contener DNA o RNA, Prusiner ha formulado una teoría única para explicar cómo los priones podrían transmitir la enfermedad causando una expansión infecciosa del plegamiento anormal de las proteínas. De acuerdo con esta teoría, un prión (denominado PrP^{Sc}) es simplemente una versión mal plegada de una proteína celular normal (denominada PrP^{C}). Cuando la proteína mal plegada PrP^{Sc} encuentra una cadena polipeptídica normal PrP^{C} en proceso de plegamiento, provoca un plegamiento anómalo en la proteína normal (Figura 22A.1). La proteína mal plegada resultante provoca un daño en la célula nerviosa del cerebro responsable de que se produzcan movimientos musculares incontrolados y posteriormente la muerte. La presencia de cantidades muy pequeñas de priones puede desencadenar el plegamiento progresivo de cadenas polipeptídicas normales PrP^{C} en sus formas incorrectas PrP^{Sc}, lo que permite a los priones reproducirse a sí mismos sin necesidad de ácidos nucleicos.

El descubrimiento de diferentes «cepas» de priones responsables de enfermedades ligeramente distintas fue incluso más sorprendente. Cuando los científicos mezclan pequeñas cantidades de distintas cepas PrP^{Sc} en tubos de ensayo separados, con grandes cantidades del mismo polipéptido PrP^{S} normal, cada tubo produce mayor cantidad del PrP^{Sc} específico de la cepa que se introdujo originalmente en el tubo. Esta posibilidad de identificar distintas cepas de priones ha permitido a los investigadores probar que más de 100 personas en el Reino Unido se han infectado con priones de «vacas locas» por comer carne de ganado enfermo, lo que tiene como resultado una forma letal de la enfermedad de las vacas locas conocida como *enfermedad de Creutzfeldt-Jakob*, o *vCJD*. Se han sacrificado casi 200.000 cabezas de ganado infectado en el Reino Unido para tratar de acabar con la propagación de la enfermedad pero podría morir más gente de vCJD por ingestión de carne de vacuno infectada en las dos décadas pasadas.

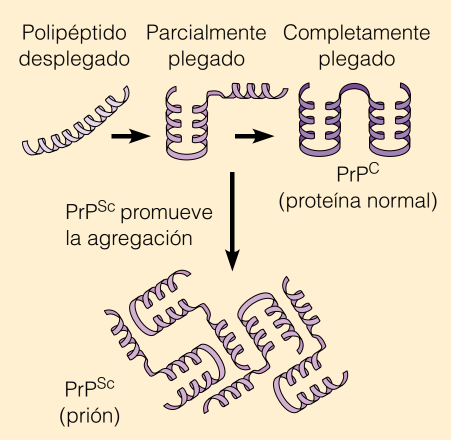


Figura 22A.1 Modelo del mecanismo por el que los priones (PrP^{Sc}) podrían promover su autopropagación.

tiene una $\Delta G^{\circ\prime}$ (energía libre estándar) de 7,3 kcal/mol, los cuatro enlaces representan un requirimiento de energía libre de 29,2 kcal/mol por cada aminoácido insertado. Así, las etapas de elongación requeridas para sintetizar un polipéptido de 100 aminoácidos tienen un valor de $\Delta G^{\circ\prime}$ de aproximadamente 2.920 kcal/mol. Es más, se utilizan GTPs adicionales durante la formación del complejo de iniciación, durante la unión transitoria de aminoacil tRNAs incorrectos al ribosoma y durante la etapa de terminación de la síntesis de polipéptidos. Claramente, la síntesis de ATP es un proceso energéticamente costoso; de hecho, supone una importante fracción de las reservas energéticas de la mayoría de las células. Si consideramos también la energía requerida para la síntesis del RNA mensajero y los componentes del aparato de la traducción, así como los requerimientos de ATP de las chaperonas, el coste energético de la síntesis de proteínas será aún mayor.

Es importante recordar que durante la traducción, el GTP no funciona como un donador típico de ATP: su hidrólisis no está directamente ligada a la formación de un enlace covalente. El GTP parece inducir cambios conformacionales en los factores de iniciación y elongación por unión y disociación con estos factores. Estos cambios conformacionales permiten a los factores unirse (no covalentemente) y ser liberados del ribosoma. Además, la hidrólisis de GTP unido a EF-Tu contribuye aparentemente a que el proceso de traducción sea preciso, porque interviene en el mecanismo de corrección de errores, que rechaza los aminoacil tRNAs incorrectos que entran en el sitio A.

Resumen de la traducción

Hemos visto que la traducción sirve como mecanismo de conversión de la información almacenada en las cadenas de codones del mRNA, en cadenas de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos. Para una visión general del proceso, puede volver a la Figura 22.7. A medida que el ribosoma lee el mRNA codón tras codón en la dirección $5' \rightarrow 3'$, los distintos aminoácidos son reclutados hacia el ribosoma por apareamiento de bases complementarias entre los codones del mRNA y los anticodones de las moléculas de aminoacil-tRNA. Cuando se encuentra un codón stop, se libera el polipéptido completo y el mRNA y las subunidades ribosómicas están de nuevo disponibles para un nuevo proceso.

La mayoría de los mensajes son leídos por varios ribosomas que se disponen continuos sobre una misma molécula de mRNA. Un conjunto de estos ribosomas unido a una molécula de mRNA se denomina **polirribosoma** (*véase* Figura 21.18). Mediante la síntesis de varios polipéptidos al mismo tiempo a partir de la misma molécula de mRNA, los polirribosomas maximizan la eficiencia de utilización del mRNA.

Las moléculas de RNA tienen funciones especialmente importantes en la traducción. El mRNA tienen un papel fundamental, obviamente, como portadores del mensaje genético. Las moléculas de tRNA funcionan como adaptadores que llevan los aminoácidos a los codones apropiados. Por último, pero no menos importante, las moléculas de rRNA tienen múltiples funciones. No sólo son componentes estructurales de los ribosomas, sino que uno de ellos (el rRNA 16S de la subunidad menor) funciona como lugar de anclaje del mRNA, y otro (el rRNA 23S de la subunidad mayor) cataliza la formación del enlace peptídico. Las importantes funciones del RNA podrían ser un vestigio evolutivo de los primeros organismos vivos. Como vimos en el Capítulo 6, el descubrimiento de RNAs catalíticos (ribozimas) ha reforzado la idea de que los primeros catalizadores de la Tierra pudieron haber sido moléculas de RNA autorreplicativas en lugar de proteínas. Así, los ribosomas de nuestros días podrían haber evolucionado a partir de un aparato de traducción primitivo basado íntegramente en moléculas de RNA.

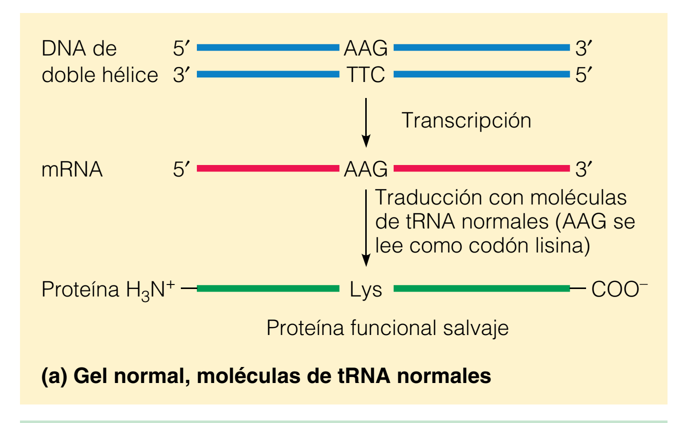
Mutación y traducción

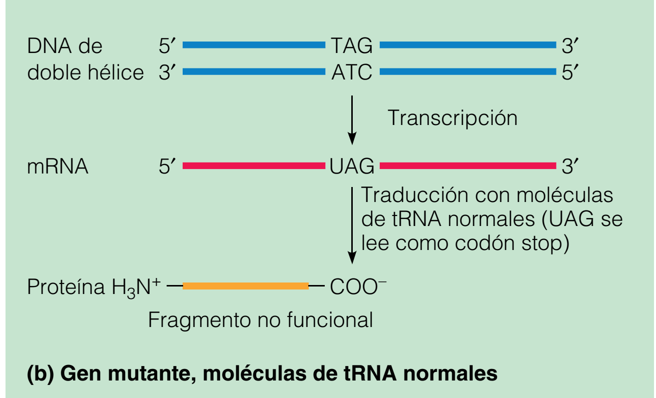
Después de la descripción del proceso *normal* de traducción, vamos a considerar lo que sucede con los mRNAs que llevan mutaciones, cuando son traducidos. El Anexo 22B da una visión general de los principales tipos de mutaciones y su impacto en las cadenas polipeptidícas producidas a partir de los mRNAs mutantes. La mayoría de las mutaciones de un codón afectan simplemente a un aminoácido y las mutaciones en la tercera base de un codón no suelen producir un cambio de aminoácido. Sin embargo, las mutaciones que añaden o eliminan codones stop, o cambian el marco de lectura pueden alterar profundamente la traducción. En esta sección, veremos distintas formas de respuesta de la célula a estas mutaciones.

Los tRNAs supresores eliminan los efectos de algunas mutaciones

Las mutaciones que convierten los codones que codifican aminoácidos en codones stop se conocen como **mutaciones sin sentido**. La Figura 22.12 representa un caso en el que la mutación en un par de bases en el DNA convierte un codón lisina AAG del mRNA en una señal UAG stop. Las mutaciones sin sentido como ésta suelen dar lugar a polipéptidos incompletos, no funcionales, que han terminado de sintetizarse prematuramente en el codón stop mutante, como muestra la Figura 22.12b.

Aunque las mutaciones sin sentido en genes esenciales suelen ser letales, los fagos con mutaciones pueden crecer en cierto tipo de bacterias. Estas bacterias especiales «suprimen» el efecto de terminación de las mutaciones sin sentido porque tienen un tRNA mutante que reconoce lo que en otras cepas sería un codón stop e inserta un aminoácido en ese lugar. En el ejemplo mostrado en la Figura 22.12c,





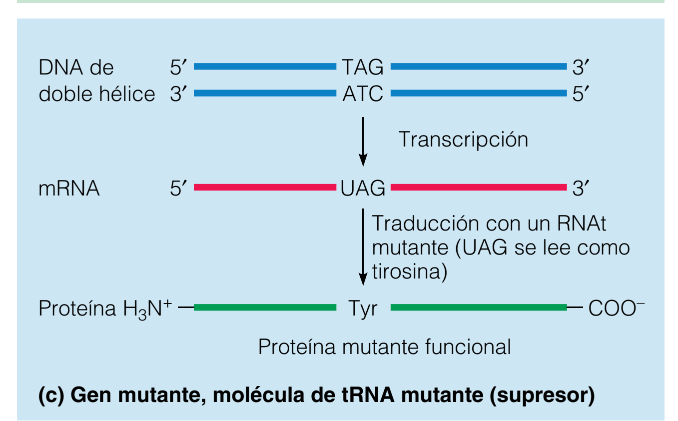


Figura 22.12 **Mutaciones sin sentido y tRNA supresores.** (**a**) Un gen salvaje (no mutado, normal) se transcribe en una molécula de mRNA que contiene el codón AAG en cierta posición. Tras la traducción, este codón codifica el aminoácido lisina (Lys) en una posición de la proteína funcional salvaje. (**b**) Si se da una mutación en el DNA que cambia el codón AAG del mRNA por UAG, el codón UAG se leerá como una señal stop, y el producto de la traducción será un polipéptido corto, no funcional. Las mutaciones de este tipo se denominan mutaciones sin sentido. (**c**) En presencia de una molécula de tRNA que lea el UAG como un codón que codifica un aminoácido en lugar de una señal stop, se insertará un aminoácido y continuará la síntesis del polipéptido. En el ejemplo mostrado, UAG se lee como codón tirosina porque el mutante tirosin-tRNA tiene como anticodón 3′-AUC-5′ en lugar del 3′-AUG-5′ común (que reconoce el codón tirosina 5′-UAC-3′). La proteína resultante será mutante porque la lisina ha sido sustituida por una tirosina en una posición determinada de la cadena. La proteína podría seguir siendo funcional si su actividad biológica no está gravemente afectada por la sustitución del aminoácido.

un tRNA mutante tiene un anticodón alterado que le permite leer el codón stop UAG como codón tirosina. El aminoácido insertado es casi siempre diferente del aminoácido que estaría presente en esa posición en la proteína no mutada, pero la característica más importante de la supresión es que previene la terminación y permite la formación de un polipéptido completo.

Una molécula de tRNA que elimina de este modo el efecto de una mutación se denomina **tRNA supresor**. Como puede imaginar, existen tRNAs supresores que eliminan los efectos de otros tipos de mutaciones además de mutaciones sin sentido (*véase* Problema 22.7 al final del capítulo). Para que la célula sobreviva, el tRNA supresor debe ser relativamente ineficiente; de lo contrario, el aparato de síntesis de proteínas produciría demasiadas proteínas anormales. Un supresor demasiado eficiente podría causar, por ejemplo, que los codones stop normales se leyeran como si codificaran un aminoácido, de modo que no se daría la terminación normal. De hecho, la síntesis de la mayoría de los polipéptidos acaba adecuadamente en las células que contienen tRNAs supresores de mutaciones sin sentido, lo que indica que el codón stop situado en el sitio adecuado para la terminación de una secuencia de mRNA sigue desencadenando la terminación, mientras que el mismo codón en una localización interna no lo hace. Esto sugiere que además de requerir un codón stop, la terminación normal implica el reconocimiento de una secuencia especial o una configuración tridimensional localizada cerca del final de la secuencia codificadora del mRNA.

La degradación mediada por codones sin sentido y la degradación por ausencia de terminación son mecanismos que facilitan la destrucción de mRNAs defectuosos

En ausencia de un tRNA supresor adecuado, un codón sin sentido puede hacer que la traducción termine prematuramente, generando por lo tanto un polipéptido incompleto. Para evitar este problema las células de los mamíferos (que normalmente carecen de tRNA supresores) destruyen los mRNAs que contienen codones stop prematuros, mediante un mecanismo denominado **degradación mediada por codones sin sentido**. La pieza clave de este mecanismo es el *complejo de unión a exones (EJC)*, un complejo multiproteico que se deposita, durante el ayuste del mRNA, en cada punto donde se elimina un intrón del pre-mRNA. Así, cada nueva molécula de mRNA tendrá uno o mas EJCs unidos, uno cerca del principio de cada unión exón-exón. Durante la traducción, la distinción entre codones stop normales y prematuros se hace en base a su relación con los EJCs. Si en un mRNA se encuentra un codón stop antes del último EJC —en otras palabras, antes del último exón—, debe ser un codón stop prematuro. Este codón dará lugar a un proceso de traducción que terminará

Un generador de mutaciones

En su sentido más amplio, el término mutación hace referencia a cualquier cambio en la secuencia de núcleotidos de un genoma. Ahora que hemos visto los procesos de transcripción y traducción, podemos comprender los efectos de varios tipos de mutaciones. Limitándonos a los genes que codifican proteínas, vamos a considerar algunos de los principales tipos de mutaciones y sus consecuencias en el polipéptido codificado por el gen mutante.

En este capítulo y en el anterior, hemos visto varios tipos de mutaciones en los que el cambio en el DNA afecta sólo a uno o unos pocos pares de bases (Figura 22B.1a). Al principio del Capítulo 21, por ejemplo, mencionamos el alelo genético que, en homocigotos, causa la anemia falciforme. Este alelo se originaba por un tipo de mutación denominado *sustitución de un par de bases.* En este caso, un par de bases AT estaba sustituido por un par TA en el DNA. Como resultado, un codón GUA sustituye a un GAA en el mRNA transcrito a partir del alelo mutante y en el polipéptido (β-globina) una valina reemplaza al ácido glutámico. Este simple cambio de aminoácido, causado por el cambio de un solo par de bases, es suficiente para alterar la conformación de la β-globina y, por lo tanto, del tetrámero de hemoglobina, modificando la forma de empaquetamiento de las moléculas de hemoglobina en los eritrocitos y produciendo células con formas anómalas que quedan atrapadas y dañadas cuando pasan a través de los vasos sanguíneos pequeños (*véase* Figura 21.3). Este tipo de sustituciones se denominan *mutaciones de cambio de aminoácido*, porque el codón mutado continúa codificando un aminoácido-pero el «incorrecto».

Por otra parte, la sustitución de un par de bases puede crear una mutación de *supresión de parada*, por conversión de un codón stop normal en un codón que codifica un aminoácido; o a la inversa, puede crear una mutación sin sentido por conversión de un codón correspondiente a un aminoácido en un codón stop. En este último caso, la maquinaria de traducción terminaría el polipéptido prematuramente. A menos que la mutación sin sentido se encuentre cerca del final del mensaje o que esté presente un supresor de tRNA, el polipéptido no será funcional. Los codones sin sentido, de supresión de stop, y de cambio de aminoácido pueden originarse también a partir de *inserciones* de pares de bases y *deleciones* que causan *mutaciones de cambio de marco de lectura.*

Un solo cambio de un aminoácido (o incluso un cambio en varios aminoácidos) no siempre afecta drásticamente a la función de las proteínas. Si la conformación tridimensional de la proteína se mantiene, es probable que la actividad biológica no se vea afectada. La sustitución de un aminoácido por otro del mismo tipo-por ejemplo valina por isoleucina-no suele afectar a la función de la proteína. La naturaleza del código genético minimiza, de hecho, los efectos de las alteraciones en un solo par de bases porque puede generar *mutaciones silenciosas* que cambian la secuencia de núcleotidos sin alterar el mensaje genético. Por ejemplo, el cambio en la tercera base de un codón suele dar lugar a un nuevo codón que sigue codificando el mismo aminoácido. En este caso, el polipéptido «mutante» es exactamente el mismo que el del gen salvaje.

Además de las mutaciones que afectan a uno o unos pocos pares de bases, algunas alteraciones implican a largos segmentos de DNA (Figura 22B.1b). Algunas afectan a fragmentos del genoma tan largos que los cambios pueden ser detectados observando los cromosomas en el microscopio óptico. Algunas de estas mutaciones a gran escala están generadas por *inserciones* o *deleciones* de largos segmentos de DNA, pero pueden darse también mediante otros mecanismos. En una *duplicación*, un segmento de DNA está repetido en tándem. En una *inversión*, un segmento del cromosoma se corta y reinserta en su posición original, pero en la dirección reversa. Una *traslocación* implica el movimiento un segmento de DNA desde su localización normal en el genoma a otro lugar, dentro del mismo cromosoma o en uno distinto. Dado que estas mutaciones a gran escala pueden o no afectar a la expresión de muchos genes, tienen un amplio rango de expresiones fenotípicas, pudiendo ser letales o inocuas.

Cuando pensamos en los posibles efectos de las mutaciones, es útil recordar que los genes tienen componentes no codificantes muy importantes y que estos también pueden estar mutados y afectar seriamente a los productos génicos. Una

mientras el mRNA tiene todavía uno o más EJCs unidos, y la presencia de estos EJCs funcionará como una señal de degradación del mRNA.

Pero, ¿cómo hacen frente las células al fenómeno opuesto, es decir, a los mRNAs carentes de codones stop? En las células eucariotas, la traducción se paraliza cuando un ribosoma encuentra el final de un mRNA sin haber encontrado un codón stop. Un complejo enzimático de degradación de RNA se une en ese momento al sitio A del ribosoma, desocupado, y degrada el mRNA defectuoso mediante un proceso conocido como **degradación por ausencia de terminación.** Este mismo problema se resuelve de manera ligeramente distinta en bacterias. Cuando la traducción se paraliza al final de un mRNA bacteriano que carece de codones stop, un tipo de RNA poco común, denominado *tmRNA* («RNA transferente-mensajero») se une al sitio A del ribosoma y promueve la adición de alrededor de una docena de aminoácidos adicionales a la cadena polipeptídica. Esta secuencia de aminoácidos funciona como una señal para la destrucción de la proteína formada. Al mismo tiempo, el mRNA es degradado por una ribonucleasa asociada al tmRNA.

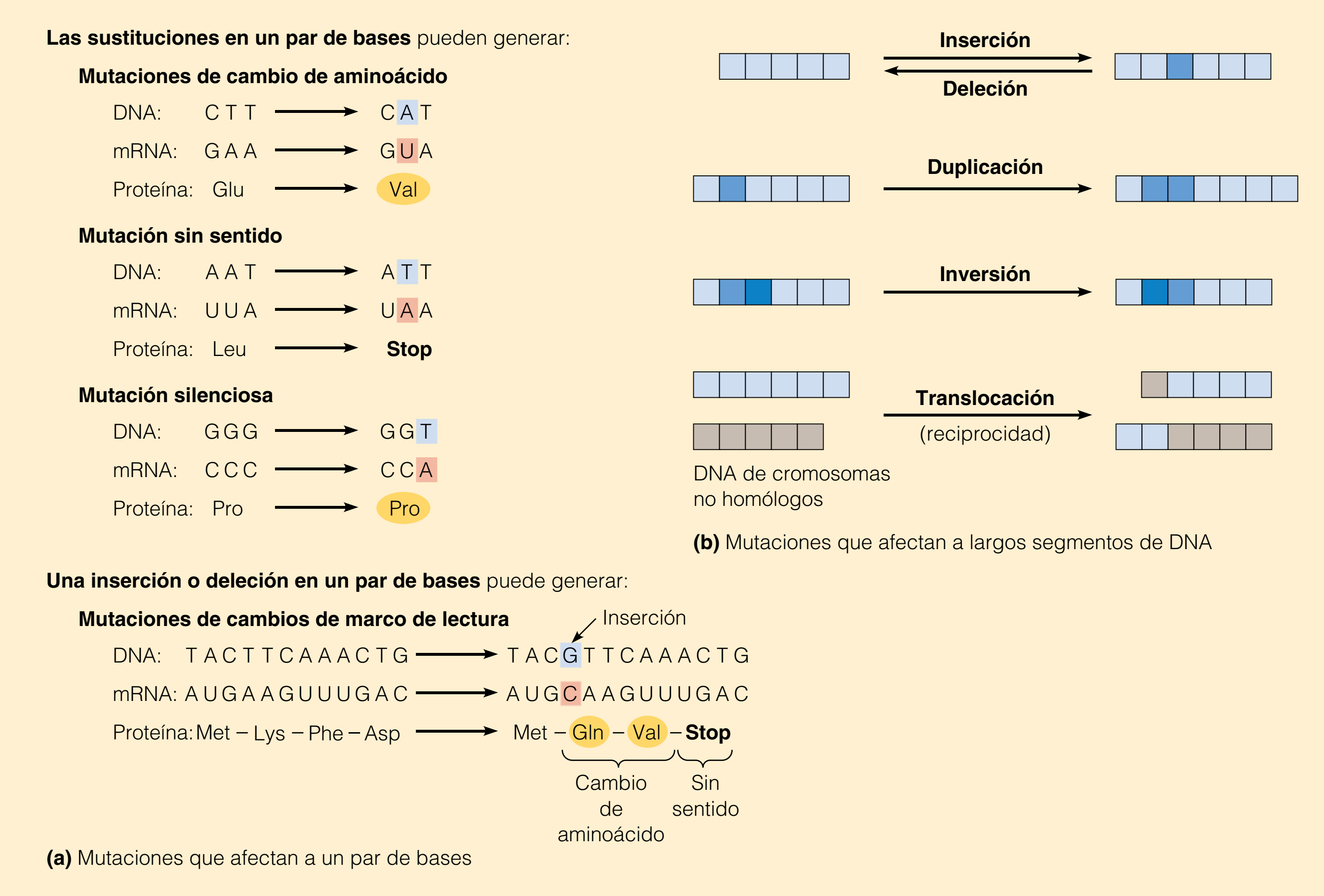


Figura 22B.1 **Tipos de mutaciones.** (**a**) Mutaciones que afectan a un par de bases. (**b**) Mutaciones que afectan a largos segmentos de DNA.

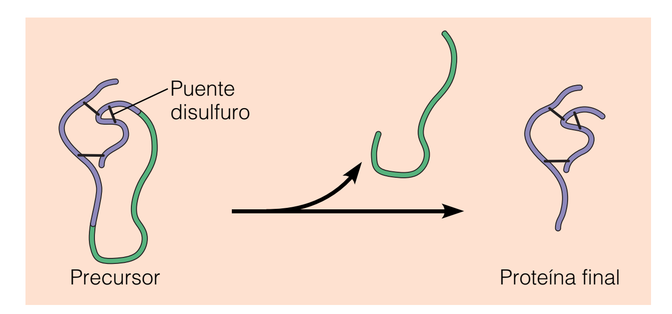
mutación en un promotor, por ejemplo, puede tener como resultado una transcripción más o menos frecuente de un gen. Incluso las mutaciones en un intrón pueden afectar al producto génico de forma importante si afecta a una región crítica de la secuencia del sitio de ayuste.

Por último, las mutaciones en genes que codifican proteínas reguladoras —es decir, proteínas que controlan la expresión de otros genes— pueden tener efectos «a distancia» sobre otras proteínas importantes. Veremos esto con más detalle en el Capítulo 23.

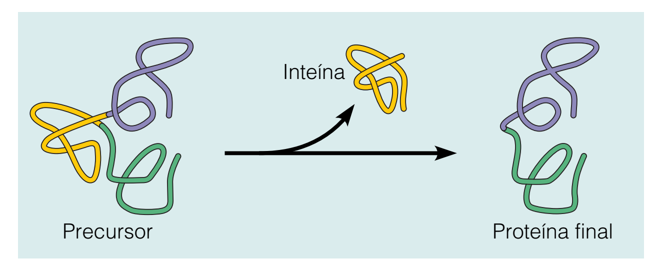
Procesamiento postraducción

Después de la síntesis de las cadenas polipeptídicas, éstas suelen ser modificadas químicamente antes de poder llevar a cabo sus funciones. En procariotas, por ejemplo, el grupo N-formil localizado en el extremo N-terminal de las cadenas polipeptídicas suele ser eliminado. Es más, la metionina a la que se encuentra unido suele eliminarse también, de la misma forma que la metionina inicial de los polipéptidos de eucariotas. Como resultado, relativamente pocos polipéptidos maduros tienen metionina en su extremo N-terminal, pese a que todos ellos se iniciaran de este modo. A veces son incluso grandes conjuntos de aminoácidos los que se eliminan del polipéptido. Ciertas enzimas, por ejemplo, son sintetizadas como precusores inactivos que deben ser activados por eliminación de una secuencia específica en uno u otro extremo. El transporte de proteínas a través de la membrana también implica la eliminación de una secuencia señal terminal, como veremos brevemente, y algunos polipéptidos tienen segmentos internos de aminoácidos que deben ser eliminados para dar lugar a la forma activa. Por ejemplo, la insulina se sintetiza como un poli-

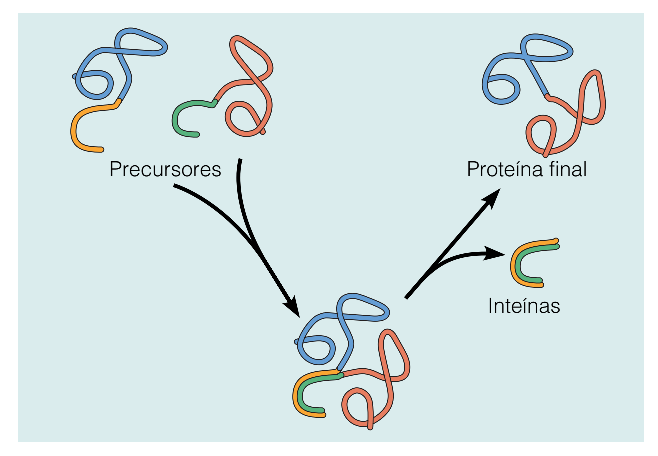
péptido que es después procesado para eliminar una secuencia interna; los dos segmentos restantes se unen mediante puentes disulfuro entre residuos de cisteína, en la hormona activa (Figura 22.13a).



(a) Corte proteolítico



(b) Ayuste de proteína (intramolecular)



(c) Ayuste de proteína (intramolecular)

Figura 22.13 Procesamiento de proteínas precursoras. Algunos polipéptidos se sintetizan como precursores inactivos de los que se deben eliminar fragmentos para dar lugar a la proteína activa. (**a**) El corte en la proteína es un mecanismo que puede usarse para eliminar varios aminoácidos de una cadena polipeptídica. Por ejemplo, la hormona proteica insulina se sintetiza como precursor inactivo (proinsulina) que después se convierte en la hormona activa eliminando enzimáticamente una larga sección del polipéptido. Las dos cadenas generadas por eliminación de esta secuencia interna permanecen conectadas por puentes disulfuro entre residuos de cisteína. Las partes (**b**) y (**c**) ilustran el mecanismo alternativo de ayuste de proteínas, en el que unas secuencias de aminoácidos denominadas inteínas se eliminan de uno o más precursores polipeptídicos y los segmentos polipeptídicos resultantes se empalman entre sí para dar lugar a una cadena polipeptídica continua.

Otros tipos de procesamiento incluyen modificaciones químicas de grupos de aminoácidos concretos —metilaciones, fosforilaciones o reacciones de acetilación, por ejemplo—. Además, un polipéptido puede ser glicosilado (adición de cadenas laterales de carbohidratos; *véase* Capítulo 12) o unirse a grupos prostéticos. Por último, en el caso de proteínas compuestas por muchas subunidades, las cadenas polipeptídicas individuales deben unirse a alguna otra forma de las proteínas del multímero o complejo multimolecular.

Además de los procesos postraducción enumerados, algunas proteínas experimentan un tipo de procesamiento relativamente inusual denominado **ayuste de proteínas**, que es análogo al fenómeno de *ayuste de RNA* expuesto en el Capítulo 21. Como vimos, las secuencias de intrones se eliminan del RNA durante el ayuste y las secuencias restantes, los exones, se empalman entre sí. De la misma forma, durante el ayuste de proteínas, unas secuencias de aminoácidos específicas denominadas *inteínas* son eliminadas de la cadena polipeptídica y los segmentos restantes, denominados *exteínas*, se empalman para dar lugar a la proteína madura. El ayuste de proteínas suele ser intramolecular e implica la escisión de una inteína a partir de una sola cadena polipeptídica mediante un mecanismo autocatalítico (Figura 22.13b). Sin embargo, el ayuste también puede darse entre dos cadenas distintas codificadas por dos mRNAs distintos. Por ejemplo, en algunas bacterias fotosintéticas se produce una subunidad de la DNA polimerasa III a partir de dos genes separados que codifican un polipéptido con una inteína, que incluye parte de la subunidad de la DNA polimerasa. Los dos polipéptidos se unen por unión entre sus segmentos de inteínas y una reacción de ayuste intermolecular une los dos polipéptidos, al tiempo que se elimina la inteína (Figura 20.22c). En algunos casos, las inteínas eliminadas por reacciones de ayuste se vuelven proteínas estables con su propia actividad endonucleasa. Por lo tanto, aunque fue considerado en principio una rareza, el ayuste de proteínas ya se ha detectado en docenas de organismos distintos, tanto procariotas como eucariotas.

Clasificación y regulación de la localización de las proteínas

Ahora que hemos visto cómo se sintetizan las proteínas, podemos explorar los mecanismos que dirigen cada nueva proteína a su destino correcto. Piense un momento en la célula eucariota típica con su diversidad de orgánulos, cada uno con su propio conjunto de proteínas. Esta célula tendría billones de moléculas de proteínas, lo que supone al menos 10.000 tipos distintos de polipéptidos. Cada uno de ellos debe encontrar su localización adecuada en la célula o fuera de ella. Un número limitado de estos polipéptidos está codificado por el genoma de la mitocondria (y en cé-

lulas vegetales, también en el cromosoma del cloroplasto), pero la mayoría son codificados por genes nucleares y sintetizados mediante un proceso que comienza en el citosol. Cada uno de estos polipéptidos debe, por lo tanto, ser dirigido a su destino adecuado y deberá tener algún tipo de «código postal» molecular que asegure su liberación en el lugar correcto. Así, como tema final de este capítulo consideraremos este proceso de clasificación y regulación de la localización de las proteínas.

Podemos empezar agrupando los distintos compartimientos de las células eucariotas en tres categorías: (1) el sistema de endomembranas, un sistema interrelacionado de compartimientos membranosos que incluye el RE, el complejo de Golgi, los lisosomas, las vesículas de secreción, la envuelta nuclear y la membrana plasmática; (2) el citosol; y (3) las mitocondrias, los cloroplastos, los peroxisomas (y orgánulos relacionados) y el interior del núcleo.

Los polipéptidos codificados por genes nucleares se dirigen a estos compartimientos mediante distintos mecanismos. El proceso comienza con la transcripción de los genes nucleares en RNAs que son procesados en el núcleo y luego transportados a través de los poros nucleares para su traducción en el citoplasma, donde se encuentran la mayoría de los ribosomas. Mientras la traducción es un proceso mayoritariamente citoplásmico, algunas evidencias recientes sugieren que un 10 % de los ribosomas de las células se encuentran en el núcleo, donde pueden traducir ARNs sintetizados «de novo». La traducción nuclear parece funcionar sobre todo como mecanismo de control de calidad que examina los nuevos mRNA, en busca de posibles errores (*véase* la explicación de la degradación mediada por mutaciones sin sentido en la página 763).

A pesar de la existencia de estos ribosomas nucleares, está claro que la mayor parte de la síntesis de polipéptidos ocurre en los ribosomas del citoplasma después de que los mRNAs hayan salido del núcleo a través de los poros nucleares. Tras su llegada al citoplasma, estos mRNAs se asocian con *ribosomas libres* (ribosomas no asociados a ninguna membrana). Poco después del inicio de la traducción, hay una divergencia de rutas para el direccionamiento de los nuevos polipéptidos (Figura 22.14). La primera ruta es utilizada por ribosomas que sintetizan polipéptidos destinados al sistema de endomembranas o que serán exportados fuera de la célula. Estos ribosomas se encuentran unidos a las membranas del RE al principio de la traducción y los polipéptidos se transfieren después a través de la membrana del RE a medida que se van sintetizando (Figura 22.14b). Las proteínas integrales de membrana quedan insertadas en la membrana en lugar de atravesarla.

Esta transferencia de polipéptidos hacia el RE se denomina **exportación cotraslacional**, porque el movimiento del polipéptido a través o hacia la membrana del RE está directamente acoplado con el proceso de traducción. El transporte posterior de estas proteínas desde el RE a sus destinos finales lo llevan a cabo varias vesículas y el complejo de Golgi, como vimos en el Capítulo 12 (*véase* la Figura 12.8).

Los péptidos destinados al citosol o a las mitocondrias, los cloroplastos, los peroxisomas y el interior nuclear (Figura 22.14c) utilizan una ruta de transporte alternativa. Los ribosomas que sintetizan este tipo de polipéptidos se encuentran libres en el citosol, no anclados a ninguna membrana. Después de que se ha completado el proceso de traducción, los polipéptidos se liberan de los ribosomas y permanecen en el citosol si éste es su destino, o bien son importados por el orgánulo adecuado. La llegada de estos polipéptidos a los orgánulos requiere la presencia de señales de localización especiales y se denomina **exportación postraducción**. En el caso del núcleo, los polipéptidos entran a través de poros nucleares, como se vio en el Capítulo 18 (Figura 18.30). La entrada de los polipéptidos a las mitocondrias, los cloroplastos y los peroxisomas, implica un mecanismo diferente, como veremos en breve.

Con esta visión general, ahora estamos preparados para examinar en detalle los mecanismos de exportación durante la traducción y después de la traducción.

La exportación durante la traducción permite que algunos polipéptidos entren en el RE a medida que se van sintetizando

La exportación cotraslacional hacia el RE es el primer paso de la ruta en la que las células distribuyen las proteínas sintetizadas «de novo» hacia distintas localizaciones del sistema de endomembranas. Las proteínas que se distribuyen por este mecanismo se sintetizan en ribosomas que se unen a la membrana poco después del inicio de la traducción. Vamos a centrarnos primero en el comportamiento de las proteínas solubles, un grupo que incluye a las proteínas que serán secretadas por la célula así como proteínas solubles que acabarán en el interior de las cisternas de las endomembranas, como el complejo de Gogi, los lisosomas o el propio RE.

Evidencia de las secuencias señal del RE. La idea de que el RE estaba implicado en el transporte de proteínas sintetizadas «de novo» hacia varias localizaciones dentro de la célula, surgió por primera vez a partir de unos estudios de Colvin Redman y David Sabatini sobre la síntesis de proteínas en vesículas aisladas del RE rugoso (vesículas del RE con ribosomas incorporados). Después de incubar brevemente las vesículas de RE rugoso en presencia de aminoácidos radiactivos y otros componentes necesarios para la síntesis de proteínas, añadieron el antibiótico *puromicina* para detener el proceso. Además de bloquear la síntesis de proteínas, la puromicina hace que las cadenas polipeptídicas, parcialmente sintetizadas, se liberen de los ribosomas. Cuando los ribosomas y las vesículas se separaron y se analizaron para ver dónde se localizaban los polipéptidos radiactivos sintetizados de novo, se encontró una fracción

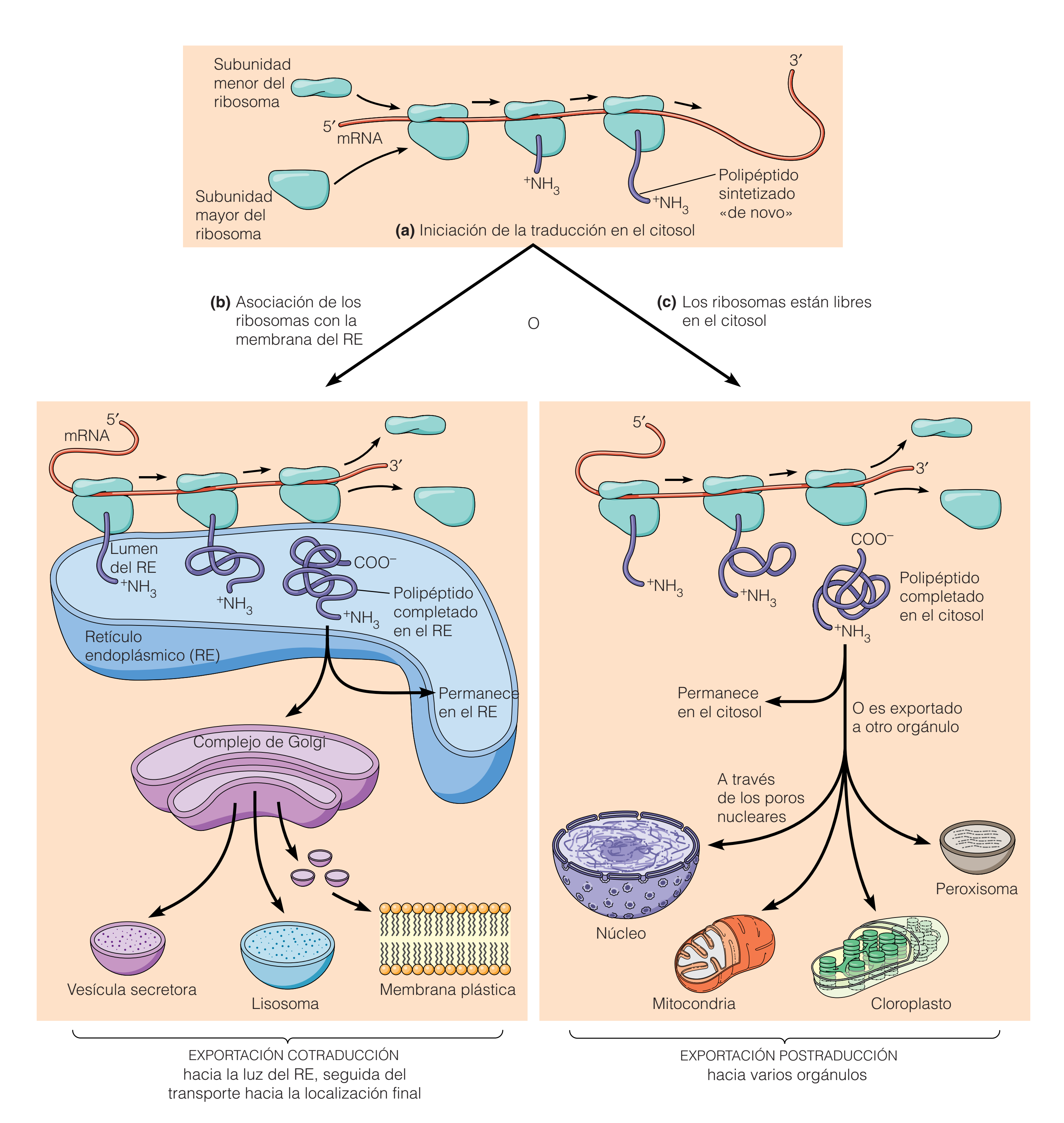


Figura 22.14 **Distribución intracelular de las proteínas.** **(a)** La síntesis de polipéptidos codificados por genes nucleares comienza en el citosol. Las subunidades mayor y menor del ribosoma se asocian entre sí y con el extremo 5′de una molécula de mRNA, formando un ribosoma funcional que empieza a formar el polipéptido. Cuando el polipéptido tiene unos 30 aminoácidos de longitud, entra en dos rutas alternativas. **(b)** Si está destinado a compartimientos del sistema de endomembranas, o va a ser exportado, el nuevo polipéptido se asocia a la membrana del RE y se transfiere a través de la membrana hacia el lumen (espacio interno) del RE y continúa la síntesis. Este proceso de importación es cotraslacional. El polipéptido completo puede permanecer en el RE o ser transportado por medio de varias vesículas al complejo de Golgi o a otra localización final. (Las proteínas integrales de membrana quedan insertadas en la membrana del RE mientras se están sintetizando, en lugar de localizarse en el lumen). **(c)** Si el destino del polipéptido es el citosol o va a importarse al núcleo, las mitocondrias, cloroplastos o peroxisomas, su síntesis continúa en el citosol. Cuando el polipéptido está completo se libera del ribosoma y permanece en el citosol, o bien es transportado al orgánulo adecuado mediante exportación postraslacional. El polipéptido entra en el núcleo a través de los poros nucleares, usando un mecanismo diferente del de exportación postraslacional que se da en otros orgánulos.

sustancial de la radiactividad en la luz del RE (Figura 22.15). Estos resultados sugerían que algunos de los nuevos polipéptidos empezaban a pasar al lumen del RE a medida que se iban sintetizando, permitiendo así su posterior transporte a las localizaciones pertinentes.

Si algunos polipéptidos pasan directamente al lumen del RE a medida que se van sintetizando, ¿cómo determina la célula qué polipéptidos son éstos? La respuesta a la pregunta la dieron Günter Blobel y David Sabatini en 1971, en un modelo que se denominó *hipótesis de la señal,* porque proponía que algún tipo de señal molecular intrínseca distingue estos polipéptidos de la gran cantidad de polipéptidos destinados al citosol. Esta hipótesis ha tenido un impacto tan grande en el campo de la biología celular, que Blobel fue galardonado con el Premio Nobel en 1999, por todos sus años de trabajo en la demostración de la validez y relevancia de la idea de que las proteínas tienen señales intrínsecas, que determinan su transporte y localización en la célula. La hipótesis de la señal indicaba que para los polipéptidos destinados al RE, el primer segmento del polipéptido en ser sintetizado, el N-terminal, contiene una secuencia señal del RE que dirige el complejo ribosoma-mRNA-polipéptido a la superficie del RE rugoso, donde el complejo se ancla a una proteína «puente» en la superficie del retículo. Después, a medida que la cadena polipeptídica se elonga durante la traducción, va atravesando la membrana del RE progresivamente entrando en el lumen (Figura 22.16).

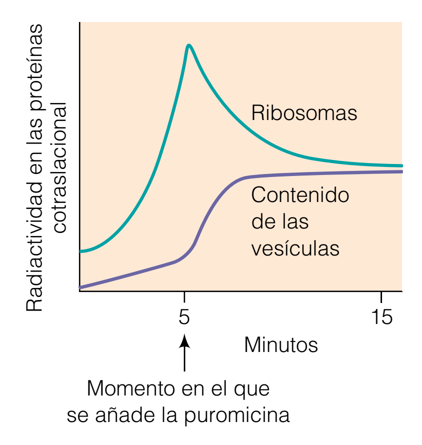


Figura 22.15 Evidencia de que las proteínas sintetizadas en los ribosomas unidos a membranas del RE pasan directamente a la luz del RE. Se aislaron e incubaron vesículas del RE que tenían ribosomas unidos con aminoácidos radiactivos para marcar las cadenas polipeptídicas sintetizadas «de novo». Después se paralizó el proceso de síntesis de proteínas por adición de puromicina, que produce también la liberación de las cadenas polipeptídicas que se están sintetizando de los ribosomas. Se separaron después los ribosomas de las vesículas y se midió la cantidad de proteína radiactiva asociada a los ribosomas y a las vesículas. La gráfica muestra que tras la adición de puromicina, la radiactividad se pierde en la muestra correspondiente a los ribosomas y aparece en el interior de las vesículas, lo que sugiere que las nuevas cadenas polipeptídicas se insertan en la membrana del RE a medida que se van sintetizando y que la puromicina hace que las cadenas se liberen prematuramente en el lumen de las vesículas.

La confirmación de que existen secuencias señal de RE la obtuvieron poco después Cesar Milstein y sus colaboradores, estudiando la síntesis la subunidad menor, o cadena ligera de la proteína *inmunoglobulina G.* En los sistemas no celulares que contienen ribosomas y los componentes necesarios para la síntesis de proteínas, el mRNA que codifica la cadena ligera de la inmunoglobulina dirige la síntesis de un polipéptido que tiene 20 aminoácidos más en el extremo N-terminal que la auténtica cadena ligera. Añadiendo membranas del RE a este sistema se produce una cadena ligera de la inmunoglobulina del tamaño correcto. Estos hallazgos sugieren que el segmento extra de 20 aminoácidos está funcionando como una secuencia señal del RE y que esta secuencia se elimina cuando el polipéptido pasa al retículo. Los estudios posteriores han revelado que otros polipéptidos destinados al RE también tienen una secuencia N-terminal necesaria para dirigir la proteína a dicho orgánulo y que esta secuencia se elimina cuando el polipéptido se trasloca. Las proteínas que contienen estas secuencias señal de RE en su extremo N-terminal se suelen denominar *preproteínas* (ej.: prelisozima, preproinsulina, pretripsinógeno, etc.).

La secuenciación de las proteínas ha revelado que la composición de aminoácidos de las secuencias señal del RE es sorprendentemente variable, pero presentan algunas características comunes. Las secuencias señal del RE suelen tener entre 15 y 30 aminoácidos y constan de tres dominios: una región N-terminal cargada positivamente, una región central hidrófoba y una región polar adyacente al sitio de corte de la proteína madura. El extremo cargado positivamente podría promover la interacción con el exterior hidrofílico de la membrana del RE y la región hidrófoba podría facilitar la interacción de la secuencia señal con el interior lipídico de la membrana. En cualquier caso, hoy día está establecido que sólo los polipéptidos con secuencias señal RE se pueden insertar o atravesar la membrana del RE a medida que se van sintetizando. De hecho, cuando se usan métodos de DNA recombinante para introducir secuencias señal en polipéptidos que no suelen tenerlas, los polipéptidos recombinantes se dirigen al RE.

Las funciones de la SRP y del translocón. Una vez que quedó confirmada la existencia de secuencias señal del RE, quedó claro en poco tiempo que los polipéptidos nacientes debían unirse a la membrana mucho antes de que la cadena polipeptídica saliese del ribosoma. Si la traducción continuara sin asociación al RE, el plegamiento de la cadena polipeptídica dejaría oculta la secuencia señal. Para entender qué es lo que evita que esto suceda, tenemos que observar el mecanismo de señalización con más detalle.

En contra de la hipótesis inicial, la secuencia señal no inicia por sí misma el contacto con el RE. El contacto está mediado por una **partícula de reconocimiento de la señal**

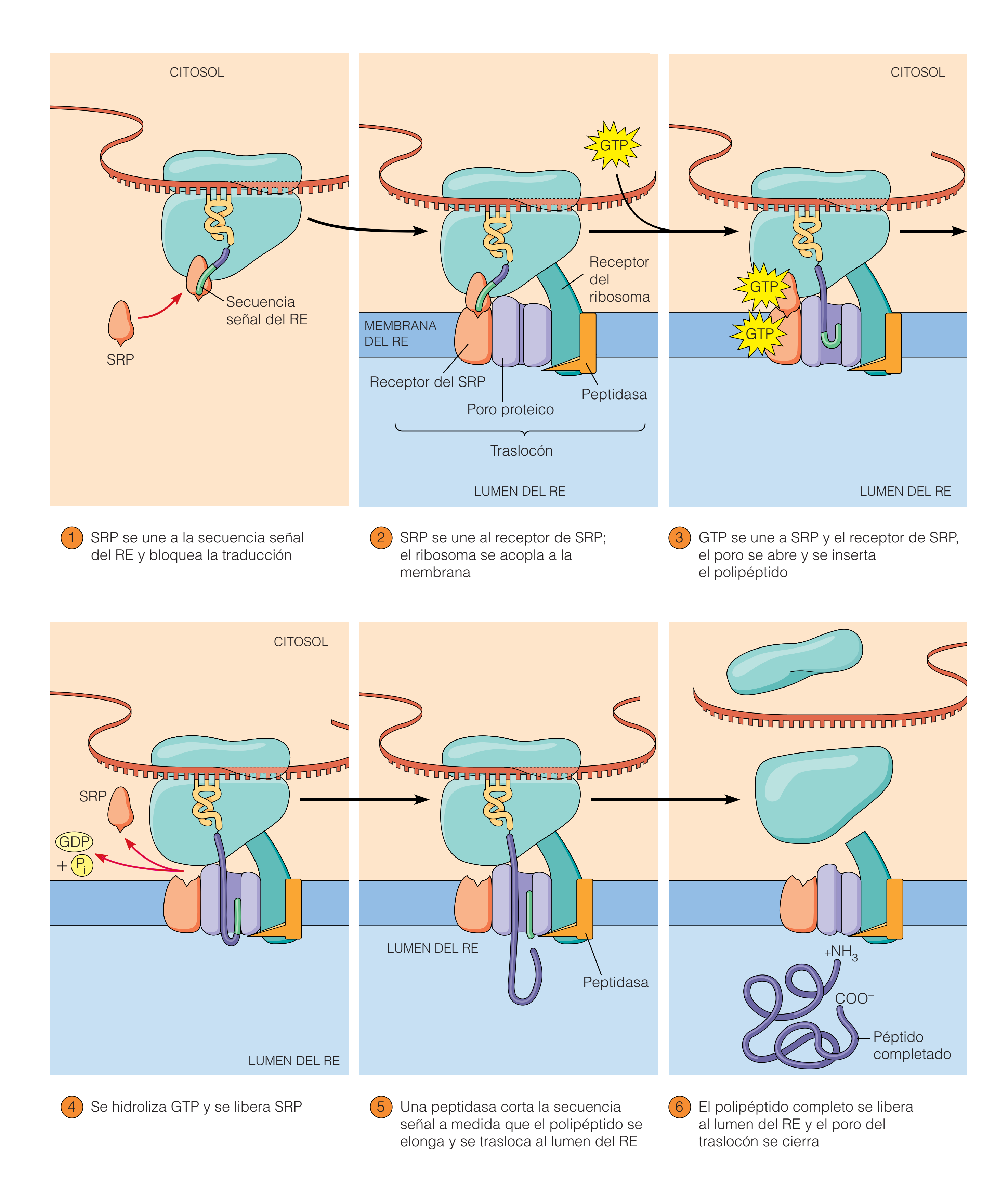


Figura 22.16 **Modelo del mecanismo de señalización del proceso de exportación cotraslacional.** Esta figura muestra un modelo actual del mecanismo de señalización. Acualmente está bien establecido que el polipéptido en formación se trasloca mediante un poro hidrófilo creado por una o varias proteínas de membrana. El complejo de proteínas de membrana que lleva a cabo la traslocación se denomina *traslocón.*

(SRP) que reconoce y se une a la secuencia señal del RE del nuevo polipéptido y después a la membrana del retículo. En principio se pensó que SRP era sólo proteica (la P de su nombre hace referencia a proteína). Más tarde, sin embargo, se vio que SRP consta de seis polipéptidos distintos asociados con una molécula de RNA de 300 nucleótidos (7S). Los componentes proteicos tienen tres sitios activos fundamentales: uno que reconoce y se une a la secuencia señal del RE, otro que interacciona con el ribosoma para bloquear la traducción y el tercero que se une a la membrana del RE.

La Figura 22.16 esquematiza el papel de la SRP en la exportación cotraslacional. El proceso empieza cuando un mRNA que codifica un polipéptido destinado al RE empieza a ser traducido en un ribosoma libre. La síntesis del polipéptido continúa hasta que se sintetiza la secuencia señal y emerge de la superficie del ribosoma. En este estadio, la SRP (en naranja) se une a la secuencia señal y bloquea el proceso de traducción (Paso ①). La SRP une después el ribosoma a una estructura especial de la membrana del RE denominada **traslocón** porque lleva a cabo la traslocación de polipéptidos a través de la membrana del RE. (Observe que el término *traslocación*, que significa literalmente «cambio de localización» se usa tanto para referirse al movimiento de proteínas a través de las membranas, como al movimiento del mRNA a través del ribosoma, como vimos al principio del capítulo).

El translocón es un complejo proteico compuesto por varios componentes implicados en la exportación cotraslacional, que incluye un receptor SRP al que se une SRP, un receptor del ribosoma, que mantiene al ribosoma en su lugar, un *poro proteico*, que forma un canal a través del cual los polipéptidos pueden entrar a la luz del RE y una peptidasa, una enzima que elimina la secuencia señal del RE. Como se muestra en ②, la SRP (con el ribosoma unido) se une primero a su receptor, permitiendo que el ribosoma se una al receptor ribosomal. Después, el GTP se une a la partícula SRP y al receptor de SRP, desbloqueando la traducción y provocando la transferencia de la secuencia señal al poro proteico, cuyo canal central se abre a medida que se va insertando ③. Más tarde se hidroliza GTP acompañado por la liberación de SRP ④. A medida que se elonga el polipéptido, pasa al lumen del RE y la peptidasa corta la secuencia señal, que es rápidamente degradada ⑤. Cuando se ha completado la síntesis, el polipéptido final se libera en la luz del RE, se cierra el canal del traslocón y el ribosoma se disocia de la membrana del RE y se separa en sus dos subunidades, liberando el mRNA ⑥.

BiP y la proteína disulfuro isomerasa. Una vez que los polipéptidos se han liberado hacia la luz del RE, se pliegan en su conformación terciaria y, en algunos casos, se asocian con otros polipéptidos para formar proteínas multiméricas que presentan estructura cuaternaria. Como vimos al principio del capítulo, el plegamiento de las proteínas está facilitado por las chaperonas moleculares. Una de las chaperonas más abundantes en el lumen del RE es una proteína denominada **BiP** (nombre derivado del término *bi*nding *p*rotein-proteína de unión en inglés). BiP, que es un miembro de la familia de las chaperonas Hsp70, se une a regiones hidrófobas de las cadenas polipeptídicas, especialmente a regiones enriquecidas en los aminoácidos triptófano, fenilalanina y leucina.

En una proteína madura, totalmente plegada, estas regiones hidrófobas están ocultas en el interior de la proteína. Sin embargo, en una cadena polipeptídica desplegada, estas mismas regiones hidrófobas están expuestas al medio acuoso en el que se encuentran, lo que genera una situación de inestabilidad en la que los polipéptidos tienden a agregarse. BiP previene la agregación de las proteínas desplegadas, uniéndose a las regiones hidrófobas de los polipéptidos desplegados, a medida que van saliendo del lumen del RE. BiP libera más tarde el polipéptido, para lo que se requiere la hidrólisis de ATP, dando a la cadena polipeptídica una breve oportunidad para plegarse adecuadamente (quizá ayudada por otras chaperonas). Si el polipéptido se pliega adecuadamente, sus regiones hidrófobas quedan encerradas en el interior de la molécula y no vuelven a unirse a BiP. Pero si los segmentos hidrófobos no se pliegan adecuadamente, BiP se une de nuevo al polipéptido y se repite el ciclo. De este modo, BiP utiliza la energía liberada por la hidrólisis de ATP para promover el plegamiento adecuado. Las proteínas que se pliegan inadecuadamente repetidas veces son reconducidas de nuevo a través de la membrana del RE al citosol donde son degradadas por la ruta de la ubicuitina-proteosoma descrita en el Capítulo 23.

Otro proceso asociado al plegamiento correcto en el lumen del RE es la formación de puentes disulfuro entre las cisteínas localizadas en diferentes regiones de una cadena polipeptídica. En los eucariotas, los puentes disulfuro están restringidos a proteínas que se sintetizan en el RE. El lumen del RE contiene la enzima **proteína disulfuro isomerasa**, que cataliza la formación y ruptura de puentes disulfuro entre los residuos de cisteína. Este proceso suele comenzar antes de que la síntesis de un nuevo polipéptido se haya completado, permitiendo que se puedan ensayar varias combinaciones de puentes disulfuro hasta que se encuentra la organización más estable.

Distribución de las proteínas solubles. La mayoría de las proteínas sintetizadas en los ribosomas que están anclados al RE son *glicoproteínas* —es decir, proteínas que se unen covalentemente a grupos carbohidrato—. Como vimos en el Capítulo 12, las reacciones de glicosilación inicial que añaden estas cadenas de carbohidratos, tienen lugar en el RE, a menudo mientras la cadena polipeptídica está aún en síntesis.

Una vez que los polipéptidos han sido liberados en la luz del RE, glicosilados y plegados, se distribuyen a través de varios componentes del sistema de endomembranas

hasta sus destinos celulares. La primera parada en esta ruta de transporte se produce en el complejo de Golgi, donde puede darse otro proceso de glicosilación y procesamiento de cadenas laterales hidrocarbonadas. El complejo de Golgi puede, por lo tanto, funcionar como lugar de clasificación y distribución de proteínas hacia otras localizaciones.

La ruta por defecto, para las proteínas solubles, conduce a éstas desde el complejo de Golgi hasta las vesículas secretoras que se dirigen hacia la superficie celular y se fusionan con la membrana plasmática, liberando las proteínas al exterior (*véase* Figura 12.8). Las proteínas solubles no destinadas a la secreción tienen ciertas cadenas laterales de carbohidratos o cortas secuencias señal de aminoácidos que las dirigen a sus localizaciones adecuadas dentro del sistema de endomembranas. Por ejemplo, en el Capítulo 12 vimos que muchas enzimas lisosomales tienen cadenas laterales de carbohidratos que contienen un azúcar poco común, la manosa-6-fosfato. Esta azúcar sirve como un dispositivo de reconocimiento que permite al complejo de Golgi empaquetar selectivamente estas proteínas en nuevos lisosomas (*véase* Figura 12.9). Existe otro tipo de señal usada por proteínas cuyo destino final es el RE. El extremo C-terminal de éstas suele contener la secuencia KDEL, que consta de los aminoácidos Lys-Asp-Glu-Leu o una secuencia relacionada. (Las letras K, D, E y L son las abreviaturas de una letra de estos cuatro aminoácidos; *véase* Tabla 3.3.) El complejo de Golgi emplea una proteína receptora que se une a la secuencia y manda a la proteína de vuelta al RE.

Inserción de proteínas integrales de membrana usando secuencias de parada de transferencia. Hasta ahora, nos hemos centrado en el transporte cotraslacional y en la distribución de *proteínas solubles* destinadas a la secreción, o a los espacios o cisternas de componentes endomembranosos, como el RE, el complejo de Golgi, los lisosomas y vesículas relacionadas. El otro grupo principal de polipéptidos sintetizados en los ribosomas del RE son las moléculas destinadas a ser *proteínas integrales de membrana.* Los polipéptidos de este tipo se sintetizan mediante un mecanismo similar al representado en la Figura 22.16 para las proteínas solubles, excepto en que el polipéptido completo permanece anclado a la membrana del RE en lugar de liberarse al lumen del RE.

Recordemos del Capítulo 7, que las proteínas integrales de membrana se suelen encontrar ancladas a la bicapa lipídica por uno o más segmentos transmembrana α-hélice que constan de 20-30 aminoácidos hidrófobos. Considerando el mecanismo que permite a estas proteínas quedar retenidas como parte de la membrana del RE tras su síntesis, en lugar de ser liberadas al lumen del RE, nos vamos a centrar en el caso más sencillo: proteínas con uno solo de estos segmentos transmembrana. Los principios que gobiernan este proceso, sin embargo, se extienden a proteínas con configuraciones más complicadas. Los investigadores postulan dos mecanismos fundamentales por los que los segmentos transmembrana hidrófobos anclan las cadenas polipeptídicas a la bicapa lipídica de la membrana del RE.

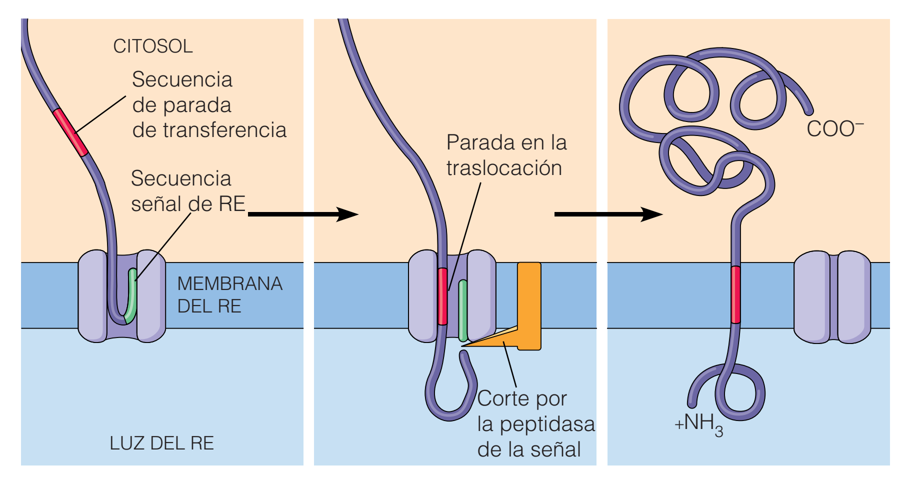
El primero de los mecanismos implica a los polipéptidos con una secuencia señal típica del RE en su extremo N-terminal, que permite a una SRP unirse al complejo ribosoma-mRNA a la membrana del RE. La elongación de la cadena polipeptídica continúa después hasta que se sintetiza el segmento transmembrana hidrófobo. Como se muestra en la Figura 22.17a, este segmento de aminoácidos funciona como una señal de parada de la transferencia que paraliza la traslocación de la cadena polipeptídica a través de la membrana del RE. La traducción continúa pero el resto del polipéptido permanece en el lado citosólico de la membrana del RE, lo que da lugar a una proteína transmembrana que tiene el extremo N-terminal en el lumen del RE y el extremo C-terminal en el citosol. Mientras tanto, la señal de parada de transferencia del segmento hidrófobo se desplaza lateralmente fuera del traslocón hacia la bicapa lipídica, formando el segmento transmembrana permanente, que ancla la proteína a la membrana.

El segundo mecanismo implica a proteínas de membrana que no presentan la secuencia señal típica en el extremo N-terminal, pero poseen una secuencia interna de iniciación de transferencia que tiene dos funciones: primero actúa como una secuencia señal que permite a una SRP unirse al complejo ribosoma-mRNA a la membrana, y después su región hidrófoba funciona como un fijador que ancla permanentemente al polipéptido a la bicapa lipídica (Figura 22.17b). La orientación de la secuencia de iniciación de la transferencia en el momento de la inserción, determina qué extremo del polipéptido queda hacia el lumen del RE y cuál en el citosol. Las proteínas transmembrana con muchas regiones de paso se insertan de una manera muy similar, excepto en que un patrón alternativo de secuencias de parada e iniciación de la transferencia, genera un polipéptido que contiene múltiples segmentos transmembrana.

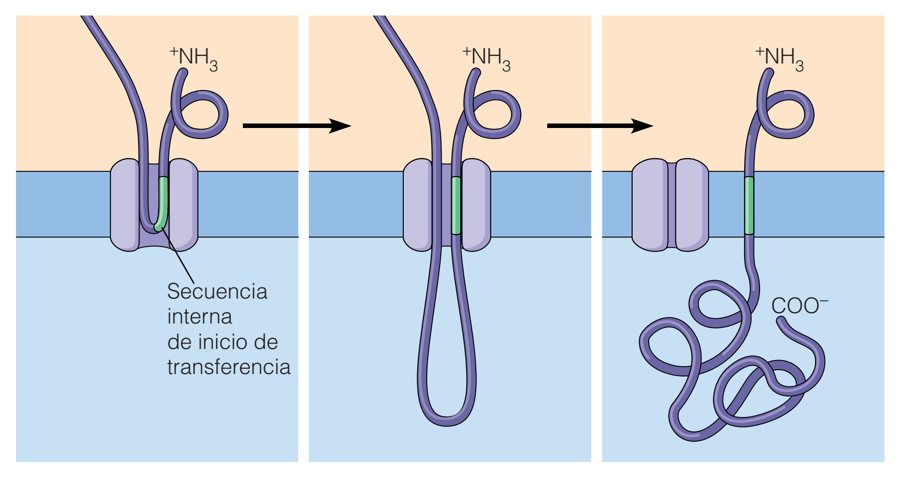
Una vez que el nuevo polipéptido se ha incorporado en la membrana por uno de los mecanismos anteriores, puede permanecer en su lugar para funcionar como proteína de membrana del RE o ser transportada a otros componentes del sistema de endomembranas, como el complejo de Golgi, los lisosomas, la envuelta nuclear o la membrana plasmática. El transporte es llevado a cabo por una serie de sucesos de evaginación y fusión en los que las vesículas salen de un compartimiento del sistema de endomembranas y se fusionan con otro, como se describió en la Figura 12.8.

El proceso de exportación postraduccional permite que algunos polipéptidos entren en orgánulos después de haber sido sintetizados

A diferencia del proceso de exportación cotraduccional de proteínas en el RE, las proteínas destinadas al interior nuclear, las mitocondrias, cloroplastos o el peroxisoma, se ex-



(a) Polipéptido con una señal interna de parada de transferencia y una secuencia señal terminal de RE



(b) Polipéptido con una señal de iniciación de transferencia interna

Figura 22.17 Inserción cotraslacional de las proteínas transmembrana en la membrana del RE. Esta figura muestra dos mecanismos propuestos para la inserción de proteínas integrales con un único segmento transmembrana. Para simplificar, la SRP, el ribosoma y la mayor parte del resto del aparato de la traducción se han omitido. (**a**) Inserción de un polipéptido con una secuencia señal de ER y una secuencia de parada de la transferencia. La secuencia de parada de la transferencia paraliza la traslocación y ancla el polipéptido a la membrana, generando una proteína transmembrana con su extremo N-terminal en la luz del RE y su extremo C-terminal en el citosol. (**b**) Inserción de un polipéptido con una sola secuencia de inicio de transferencia interna con el polipéptido de inicio transferido y anclado permanentemente en la membrana. Si este polipéptido tuviera también una señal de parada de transferencia que evitase la transferencia completa del polipéptido a través del translocón, el resultado sería una proteína transmembrana con los dos extremos, C y N-terminal, en el citosol. Las proteínas transmembrana cuyos extremos C y N-terminal están orientados en direcciones opuestas a las mostradas en esta figura, pueden generarse mediante secuencias de inicio de transferencia que tienen la orientación opuesta cuando se insertan en el aparato de traslocación.

portan hacia estos orgánulos *después* de que el proceso de traducción haya finalizado. Dado que estas proteínas se sintetizan en ribosomas libres y se liberan al citosol, cada proteína debe tener algún tipo de señal que las dirija al orgánulo correcto. En el Capítulo 12, vimos que la secuencia serina-lisina-leucina (SKL en el código de una letra) localizada cerca del extremo C-terminal de una proteína, la dirige a los peroxisomas. Y en el Capítulo 18 vimos que la exportación postraducción de proteínas al núcleo depende de *señales de localización nuclear* que dirigen el transporte de las proteínas a través de los complejos de los poros nucleares (*véase* Figura 18.30). Aquí nos centraremos en la exportación de proteínas hacia las mitocondrias y los cloroplastos, que requiere secuencias señal similares a las utilizadas para la exportación cotraslacional.

Exportación de polipéptidos a mitocondrias y cloroplastos. Aunque tanto las mitocondrias como los cloroplastos contienen sus propios DNAs y maquinaria de síntesis de proteínas, sintetizan relativamente pocos de los polipéptidos que requieren. La mayor parte de las proteínas que residen en estos dos orgánulos, así como todas las proteínas del núcleo y los peroxisomas, están codificadas por genes nucleares y se sintetizan en los ribosomas del citosol. (Los pocos polipéptidos que se sintetizan directamente en la mitocondria están destinados principalmente a la membrana interna de la mitocondria, y los polipéptidos sintetizados en los cloroplastos se localizan finalmente en las membranas de los tilacoides. Casi sin excepción, los polipéptidos codificados por genes de las mitocondrias y cloroplastos son subunidades de proteínas multiméricas, con una o más subunidades codificadas por genes nucleares e importadas del citosol.)

La mayoría de los polipéptidos de las mitocondrias y los cloroplastos se sintetizan en los ribosomas del citosol, se liberan al citosol y se exportan a los orgánulos adecuados (mitocondrias o cloroplastos) en pocos minutos. La secuencia de direccionamiento de estos polipéptidos se denomina **secuencia de tránsito**. Igual que la secuencia señal del RE, la secuencia de tránsito está localizada en el extremo N-terminal del polipéptido. Una vez en la mitocondria o el cloroplasto, la secuencia de tránsito se elimina mediante

una *peptidasa de tránsito* localizada dentro del orgánulo. La eliminación de la secuencia de tránsito siempre sucede antes de que el proceso de transporte se haya completado.

Las secuencias de tránsito de los polipéptidos de las mitocondrias y los cloroplastos suelen contener tanto aminoácidos hidrófobos como hidrófilos. La presencia de aminoácidos cargados positivamente es crítica, aunque la estructura secundaria puede ser más importante que los aminoácidos concretos. Por ejemplo, algunas secuencias mitocondriales de tránsito tienen aminoácidos cargados positivamente, intercalados con aminoácidos hidrófobos, de manera que cuando la secuencia se pliega en forma de hélice α, la mayor parte de los aminoácidos cargados positivamente están en una cara de la hélice y los aminoácidos hidrófobos en la otra.

La entrada de los polipéptidos con secuencia de tránsito está mediada por complejos de transporte especializados localizados en las membranas interna y externa de las mitocondrias y los cloroplastos. Como se muestra en la Figura 22.18, los complejos de transporte mitocondrial se denominan **TOM** (traslocasa de la membrana mitocondrial externa) y **TIM** (traslocasa de la membrana mitocondrial interna); los complejos comparables del cloroplasto son **TOC** (traslocasa de la membrana externa del cloroplasto) y **TIC** (traslocasa de la membrana interna del cloroplasto). Los polipéptidos son seleccionados inicialmente para ser transportados a las mitocondrias o los cloroplastos por componentes de TOM o TOC conocidos como *receptores de las secuencias de tránsito*. Una vez que la secuencia se ha unido a este receptor, el polipéptido que contiene la secuencia se trasloca a través de la membrana externa por un *poro* del complejo TOM o TOC. Si el polipéptido está destinado al interior del orgánulo, el movimiento a través de TOM o TOC se continuará inmediatamente con el desplazamiento a través de los complejos TIM o TIC de la membrana interna, presumiblemente en un *sitio de contacto* donde las membranas interna y externa están muy próximas.

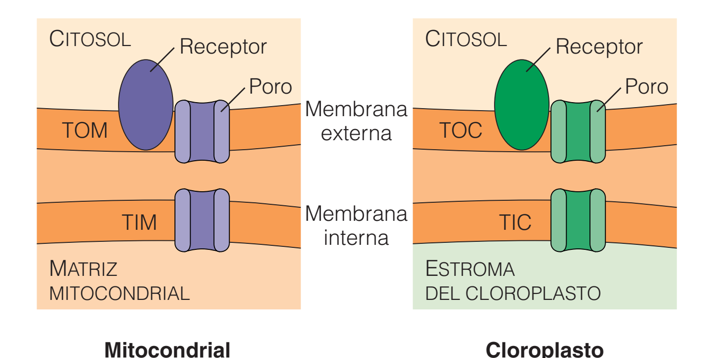


Figura 22.18 Principales complejos de transporte de las membranas interna y externa de las mitocondrias y los cloroplatos. Los polipéptidos de las mitocondrias y los cloroplastos que se sintetizan en el citosol son transportados hacia estos orgánulos mediante complejos de transporte especializados localizados en sus membranas externa e interna. En la mitocondria, los complejos de membrana interna y externa se denominan TIM y TOM respectivamente; las estructuras comparables en los cloroplastos son TIC y TIM. Los complejos de transporte de las membranas externas (TOM y TOC) constan de dos tipos de componentes: proteínas receptoras que reconocen y se unen a los polipéptidos con secuencias concretas para estos orgánulos, y poros proteicos que forman canales a través de los cuales los polipéptidos se traslocan hacia el interior.

Algunas evidencias que apoyaban este modelo proceden de estudios de microscopía electrónica, que revelaron que existían muchos sitios de contacto entre las membranas interna y externa, y de experimentos bioquímicos, en los que los sistemas de importación mitocondrial *in vitro* se incuban en hielo para atrapar los polipéptidos en el momento de la traslocación (Figura 22.19). La baja temperatura hace que el movimiento del polipéptido se paralice poco después de empezar. En este momento, los polipéptidos ya han perdido sus secuencias de tránsito por acción de la peptidasa de tránsito localizada en la matriz mitocondrial, pero todavía pueden ser atacados por enzimas proteolíticas añadidas. Estos resultados indican que los polipéptidos pueden extenderse transitoriamente entre ambas membranas durante la importación; en otras palabras, el extremo N-terminal puede entrar en la matriz mitocondrial mientras el resto de la molécula está todavía fuera del orgánulo.

Generalmente, los polipéptidos que entran en las mitocondrias y los cloroplastos deben ser desplegados antes de pasar a través de las membranas de estos orgánulos. Este requerimiento ha quedado demostrado por unión de polipéptidos que contienen secuencias de tránsito mitocondrial a agentes que mantienen la cadena polipeptídica en un estado de fuerte plegamiento. Estos polipéptidos se unen a la superficie externa de la mitocondria, pero no se mueven a través de la membrana, aparentemente porque el tamaño del polipéptido plegado supera el diámetro del poro de la membrana a través del cual debe pasar.

Para mantener el estado de plegamiento necesario, los polipéptidos destinados a las mitocondrias y los cloroplastos están unidos a chaperonas similares a las que ayudan a plegarse a los polipéptidos sintetizados *de novo*. La Figura 22.20 muestra un modelo actual de este proceso de importación de polipéptidos a la matriz mitocondrial mediada por chaperonas. Para empezar el proceso, las chaperonas de tipo Hsp70 se unen a un polipéptido que se está sintetizando en el citosol, manteniéndolo en un estado ligeramente plegado (paso ①). Después, la secuencia de tránsito del extremo N-terminal del polipéptido se une al receptor del complejo TOM, que sobresale de la superficie de la membrana mitocondrial externa (②). Se liberan entonces las chaperonas y se produce al mismo tiempo la hidrólisis de ATP, al tiempo que el polipéptido es traslocado a través de los poros de TOM y TIM hacia la matriz mitocondrial (③). Cuando la secuencia de tránsito asoma en la matriz, es eliminada por la peptidasa de tránsito (④). A medida que el resto del polipéptido entra después en la matriz, las moléculas de Hsp70 mitocondrial se unen a él temporal-

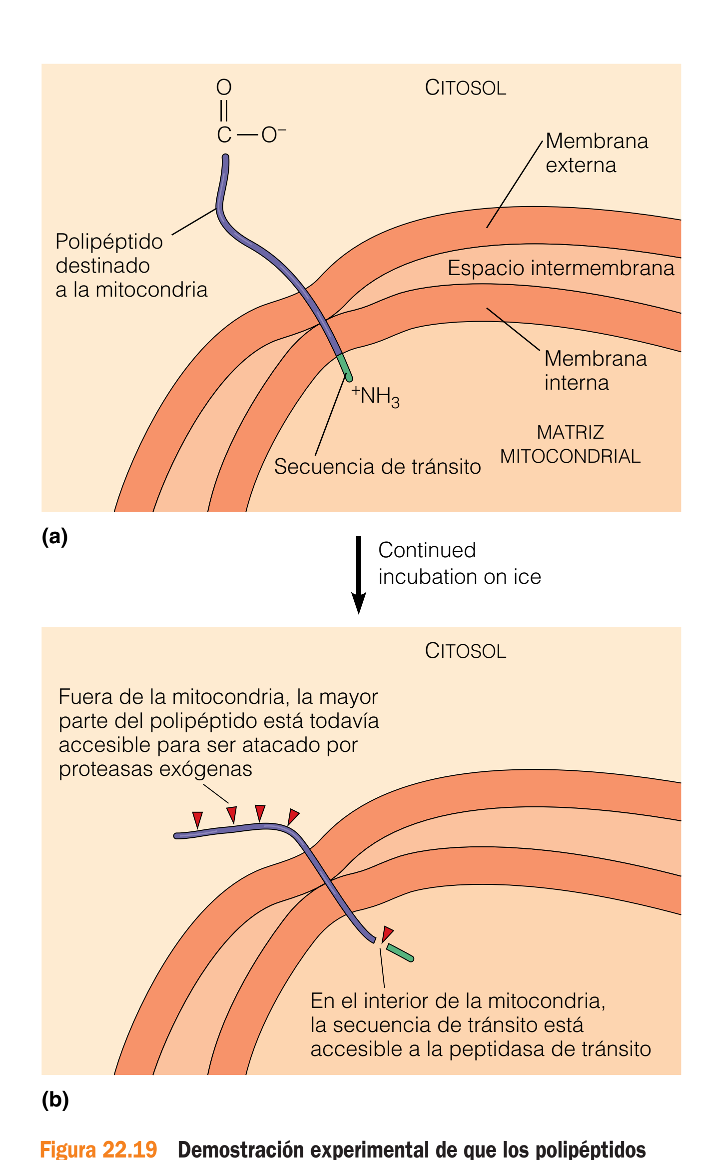


Figura 22.19 Demostración experimental de que los polipéptidos cruzan las dos membranas mitocondriales durante la importación. (**a**) Para demostrar que los polipéptidos que están siendo importados a la mitocondria cruzan las dos membranas al mismo tiempo, el sistema de importación *in vitro* se incubó en hielo, en lugar de hacerlo a la temperatura habitual de 37 °C. A baja temperatura, los polipéptidos pueden empezar a penetrar en la mitocondria, pero su traslocación se paraliza. (**b**) En estas condiciones, la secuencia de tránsito es cortada por la peptidasa de tránsito presente en la matriz, indicando que el extremo N-terminal del polipéptido está dentro de la mitocondria. Al mismo tiempo, la mayor parte del polipéptido está todavía accesible para ser atacada por enzimas proteolíticas exógenas fuera de la mitocondria. Así, concluimos que el polipéptido debe atravesar ambas membranas transitoriamente durante la importación, presumiblemente en un sitio de contacto entre las dos membranas.

mente; su posterior liberación también requiere la hidrólisis de ATP (⑤). Se piensa que es esta última hidrólisis de ATP lo que dirige realmente la traslocación. Por último, en muchos casos las moléculas de Hsp60 mitocondriales se unen al polipéptido y le ayudan a plegarse totalmente en su conformación final (⑥).

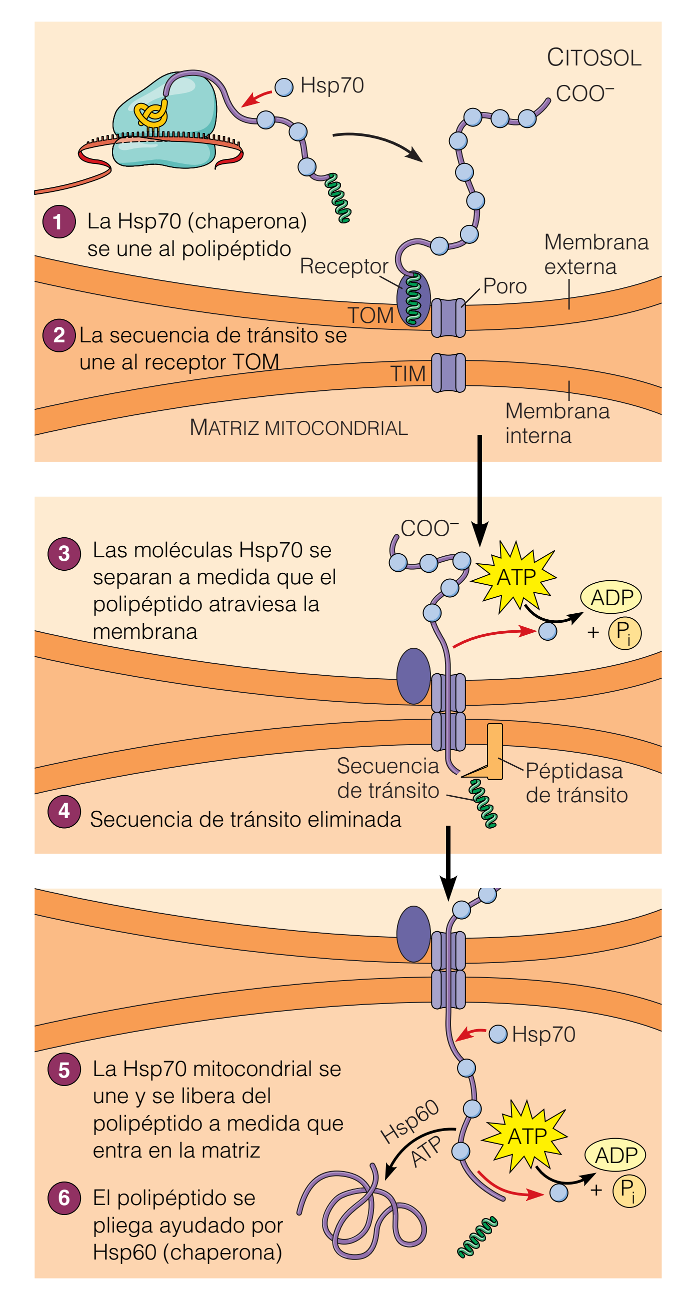


Figura 22.20 Importación postraslacional de polipéptidos por la mitocondria. Al igual que la importación cotraslacional por el RE, la importación postraducción por la mitocondria implica la presencia de una secuencia señal (denominada secuencia de tránsito en este caso), un receptor de membrana, proteínas de membrana que forman un poro y una peptidasa. Sin embargo, en la mitocondria, el receptor de membrana reconoce la secuencia señal directamente, sin la intervención de una SRP citosólica. Es más, las chaperonas tienen funciones fundamentales en el proceso mitondrial: Mantienen el polipéptido parcialmente desplegado tras la síntesis en el citosol, de manera que se puedan producir la unión de la secuencia de tránsito y el proceso de traslocación (pasos ①-③); las chaperonas dirigen la traslocación por unión y liberación de los polipéptidos *dentro* de la matriz, en un proceso dependiente de ATP (paso ⑤; y ayudan al polipéptido a plegarse en su conformación final (paso ⑥). Las chaperonas incluidas aquí son versiones citosólicas y mitondriales de Hsp70 (en azul) y una Hsp60 mitocondrial (no representada).

Tanto los cloroplastos como las mitocondrias requieren energía para importar polipéptidos. La importación de polipéptidos hacia la mitocondria requiere la hidrólisis de ATP y un gradiente electroquímico a través de la membrana interna. El gradiente electroquímico parece ser necesario sólo para la unión y penetración de la secuencia de tránsito. Una vez que se ha dado este paso, la disipación experimental del potencial de membrana no interfiere con el resto del proceso de transferencia. Los cloroplastos mantienen, por otra parte, un gradiente electroquímico a través de la membrana de los tilacoides, pero no a través de la membrana interna. Presumiblemente, los requerimientos energéticos para el importe hacia el estroma del cloroplasto se basan en el ATP.

Direccionamiento de polipéptidos a los compartimentos adecuados dentro de las mitocondrias y los cloroplastos. Debido a la complejidad estructural de las mitocondrias y los cloroplastos, las proteínas que van a ser exportadas del citosol deben dirigirse no sólo al orgánulo correcto, sino al compartimiento adecuado dentro del orgánulo. Las mitocondrias tienen cuatro compartimientos: la membrana externa, el espacio intermembrana, la membrana interna y la matriz. Los cloroplastos tienen cuatro compartimentos similares (en los que el estroma sustituye a la matriz) y dos compartimentos adicionales: la membrana de los tilacoides y el lumen del tilacoide. Así, un polipéptido podría tener que atravesar una, dos e incluso tres membranas para alcanzar su destino final.

Dada la complejidad estructural de ambos orgánulos, quizá no sea sorprendente que muchos polipéptidos de las mitocondrias y cloroplastos requieran más de una señal para llegar a sus destinos adecuados. Por ejemplo, el direccionamiento de un polipéptido a las membranas externa o interna de la mitocondria requiere una secuencia de tránsito N-terminal para dirigir el polipéptido a la mitocondria, además de una secuencia de inserción adicional, denominada *señal de clasificación hidrófoba*, para dirigir el polipéptido a su destino final. En estos casos, la señal de clasificación hidrófoba actúa como una secuencia de parada de transferencia que bloquea la traslocación del polipéptido a través de las membranas interna y externa. La señal de clasificación hidrófoba permanece entonces embebida en la membrana, anclando el polipéptido a la bicapa lipídica, mientras que la secuencia de tránsito N-terminal normalmente se elimina. También se utiliza una combinación de secuencias de clasificación hidrófobas para dirigir el polipéptido al espacio intermembrana. En este caso, las secuencias señal pasan a través de la membrana externa y se eliminan las secuencias señal, quedando el polipéptido en el espacio comprendido entre las dos membranas.

También hay muchas señales implicadas en el direccionamiento de algunos polipéptidos de cloroplastos a su destino final. Los polipéptidos que deben quedar insertados en (o transportados a través de) la membrana del tilacoide, por ejemplo, deben ser dirigidos primero hacia el cloroplasto y transportados al estroma, seguramente atravesando las membranas externa e interna a través de un sitio de contacto entre ambas. En el estroma, la secuencia de tránsito utilizada para este primer paso es eliminada del polipéptido, desenmascarando una *secuencia señal del tilacoide* hidrófoba que dirige al polipéptido a la membrana del tilacoide o bien al lumen tilacoidal. En los polipéptidos destinados a la membrana tilacoidal, la secuencia señal hidrófoba se puede insertar espontáneamente y anclar al polipéptido en la bicapa lipídica de la membrana. Alternativamente, la inserción de algunos polipéptidos en la membrana del tilacoide requiere la participación de una proteína dependiente de GTP parecida a la partícula de reconocimiento de señal (SRP) que se une a los polipéptidos y los dirige a las membranas del RE (*véase* Figura 22.16).

Los polipéptidos destinados al lumen tilacoidal son translocados complemente a través de la membrana de los tilacoides y se produce la liberación de la secuencia señal del tilacoide a medida que el polipéptido se libera en la luz. La mayoría de los polipéptidos dirigidos al lumen se translocan a través de la membrana del tilacoide en un estado desplegado mediante un proceso dependiente de ATP, que se asemeja al mecanismo empleado para translocar polipéptidos a través las membranas externas de las mitocondrias y cloroplastos. Sin embargo, se ha descubierto recientemente que algunas proteínas totalmente plegadas pueden ser transportadas a través de las membranas de los tilacoides mediante un mecanismo alternativo, conducidas por la energía derivada del gradiente de protones. Aunque la traslocación de proteínas plegadas a través de las membranas es relativamente poco común, se han detectado mecanismos similares en los peroxisomas y la membrana plasmática bacteriana.

Perspectiva

La traducción es el proceso mediante el cual los polipéptidos son sintetizados en los ribosomas de la célula. La maquinaria celular de traducción está dirigida por distintos tipos de RNA. Los RNAs mensajeros determinan el orden de los aminoácidos en el polipéptido, el tRNA lleva el aminoácido al ribosoma y el rRNA ayuda al posicionamiento del mRNA en el ribosoma, y cataliza la formación del enlace peptídico. Además, algunos factores proteicos desencadenan procesos específicos durante las etapas de iniciación, elongación y terminación de la traducción. La unión y la hidrólisis de GTP di-

rigen los cambios conformacionales de los factores proteicos. La especificidad requerida para unir el aminoácido correcto a las moléculas de tRNA adecuadas, es una propiedad de las aminoacil-tRNA sintetasas, que catalizan estas reacciones. Una vez que se produce la unión del mRNA, las subunidades ribosomales y el aminoacil tRNA iniciador para formar el complejo de iniciación, otros aminoacil tRNAs reconocen los sucesivos codones del mRNA y añaden sus aminoácidos a la cadena polipeptídica en formación. El proceso de terminación se da cuando se encuentra uno de los codones stop, y el polipéptido completo se libera después del ribosoma. El plegamiento adecuado de los polipéptidos liberados suele estar facilitado por chaperonas. Las anomalías en el proceso de plegamiento pueden provocar distintas enfermedades, como la de Alzheimer o el «mal de las vacas locas».

Conocer el código genético y los detalles del proceso de traducción nos permite comprender los efectos deletéreos de las mutaciones sin sentido y saber cómo pueden ser suprimidas por mutaciones compensatorias en el tRNA. El efecto fenotípico de una mutación que cambia un codón que codifica un aminoácido por un codón stop, puede ser suprimido si un tRNA con el anticodón mutado lee el codón stop como un aminoácido.

Las proteínas alcanzan su destino final en la célula mediante dos rutas generales, que implican en ambos casos la selección y direccionamiento de los polipéptidos. La estrategia general se basa en que los polipéptidos sintetizados «de novo» tienen secuencias especiales de aminoácidos que sirven como señales de direccionamiento; algunas proteínas reconocen selectivamente estas señales, lo que permite la clasificación de los polipéptidos. En una de las rutas, las proteínas destinadas a ser componentes del sistema de endomembranas o a ser secretadas, se importan cotraslacionalmente por el RE. La secuencia señal que dirige estos polipéptidos al RE está localizada en el extremo N-terminal del nuevo polipéptido. Una SRP del citosol se une a la secuencia señal y posteriormente a un receptor de SRP de la membrana del RE, anclando el complejo ribosoma-mRNA-polipéptido a la membrana. A medida que tiene lugar la síntesis del polipéptido, se produce la traslocación del polipéptido a través de la membrana del RE mediante un poro proteico. La secuencia señal es eliminada por una peptidasa, permitiendo al polipéptido resultante plegarse en su conformación tridimensional final. Los polipéptidos que se insertan en la membrana del RE tienen una o más señales internas de parada de transferencia, en lugar de o además de una secuencia señal de RE terminal. La mayor parte de las proteínas que se sintetizan en el RE están glicosiladas; algunas de estas cadenas laterales de oligosacáridos sirven como señales de regulación de la localización celular que dirigen las proteínas a otras partes del sistema de endomembranas.

En la otra ruta general de clasificación, las proteínas destinadas al interior nuclear, las mitocondrias, los cloroplastos o los peroxisomas se sintetizan en ribosomas del citosol (al igual que las proteínas que permancen en el citosol) y son exportadas después de la traducción al orgánulo de destino. Los polipéptidos destinados a los peroxisomas contienen una secuencia especial de direccionamiento cerca del extremo C-terminal, mientras que aquéllas destinadas al núcleo contienen señales de localización nuclear que promueven su paso a través de los poros nucleares. El direccionamiento hacia las mitocondrias y los cloroplastos requiere una señal de tránsito localizada en el extremo N-terminal. Los polipéptidos son transportados a estos orgánulos en sitios de contacto donde las membranas externa e interna están muy próximas. En esta ruta, las proteínas receptoras de la membrana externa reconocen directamente las secuencias de tránsito. La energía necesaria para el transporte de polipéptidos desplegados a la mitocondria se obtiene de la hidrólisis de ATP asociada a la liberación de la chaperona, y del gradiente electroquímico a través de la membrana interna. En los cloroplastos, el transporte de polipéptidos desplegados al orgánulo está dirigido sólo por la hidrólisis de ATP, pero es necesario el gradiente electroquímico para el transporte de algunas proteínas plegadas al la luz del tilacoide.

Dado que las mitocondrias y los cloroplastos tienen múltiples compartimientos (cuatro y seis, respectivamente) a los que pueden dirigirse los polipéptidos, las proteínas de los cloroplastos y las mitocondrias suelen requerir más de una señal para llegar a sus destinos finales. Estos polipéptidos suelen tener una secuencia de tránsito N-terminal para dirigir el polipéptido al orgánulo, además de una señal de clasificación hidrófoba para dirigirlo a su localización final.

Problemas

Los problemas de mayor dificultad están marcados con un •.

22.1 El código genético y dos hormonas humanas. La siguiente secuencia corresponde a un pequeño segmento de DNA real:

3′AATTATACACGATGAAGCTTGTGACAGGGTTTCCAATCATTAA5′
5′TTAATATGTGCTACTTCGAACACTGTCCCAAAGGTTAGTAATT3′

(a) ¿Qué dos moléculas de RNA podrían ser transcritas a partir de este DNA?

(b) Sólo una de estas dos moléculas podría ser transcrita realmente. Explique por qué.

(c) La molécula de RNA que puede ser transcrita es el mRNA que codifica la hormona vasopresina. ¿Cuál es la secuencia de aminoácidos de la vasopresina? (El código genético está representado en la Figura 21.8.)

(d) En su forma inactiva, la vasopresina es un nonapéptido (es decir, tiene nueve aminoácidos) con una cisteína en su extremo N-terminal. ¿Cómo podría explicar esto en función de tu respuesta al apartado c?

(e) Una hormona relacionada, la oxitocina, tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

Cys-Tyr-Ile-Glu-Asp-Cys-Pro-Leu-Gly

¿En qué lugar y cómo podría cambiar el DNA que codifica la vasopresina para que codificara la oxitocina? ¿Sugiera su respuesta alguna posible relación evolutiva entre los genes de la vasopresina y la oxitocina?

22.2 Localizando mutaciones. El siguiente diagrama muestra los aminoácidos que se generan como resultado de mutaciones en un aminoácido concreto de un polipéptido bacteriano:

Arg → Ile
Arg → Lys → Thr → Ser
Lys → Stop

Asuma que cada flecha simboliza la sustitución de un par de bases en el DNA bacteriano.

(a) Volviendo al código genético representado en la Figura 21.8, determine los codones más probables para cada aminoácido y el codón stop del diagrama.

(b) Partiendo de una población de células mutantes que tienen mutaciones sin sentido, se aísla otro mutante en el que se suprime una señal de stop. Asumiendo que no se da balanceo y que se ha producido el cambio en una sola base del anticodón, ¿cuáles son los aminoácidos que se podrían encontrar en la posición del aminoácido mutado en cuestión?

22.3 Iniciación de la traducción. El diagrama de la Figura 22.8 representa la iniciación de la traducción en procariotas. Dibuje un diagrama similar, marcando los pasos del proceso de iniciación en eucariotas. ¿Cúales son las principales diferencias entre los procesos de iniciación en procariotas y eucariotas?

22.4 Comparando los procesos de síntesis de proteínas en eucariotas y procariotas. Para cada una de las siguientes afirmaciones, indique si se pueden aplicar a la síntesis de procariotas (P), eucariotas (E), ambos (A) o ninguno (N).

(a) El mRNA tiene un sitio de unión al ribosoma dentro de su secuencia inicial.

(b) AUG es un codón de iniciación.

(c) La enzima que cataliza la formación del enlace peptídico es una molécula de ARN.

(d) El RNA se traduce en dirección $3' \rightarrow 5'$.

(e) El extremo C-terminal del polipéptido es el último en sintetizarse.

(f) La terminación de la traducción es llevada a cabo por moléculas de tRNA especiales que reconocen codones stop.

(g) La hidrólisis de GTP induce cambios conformacionales en varias proteínas implicadas en la elongación del polipéptido.

(h) La unión de los aminoácidos al tRNA requiere la hidrólisis de ATP.

(i) La especificidad requerida para unir los aminoácidos adecuados a las moléculas de tRNA correctas es una propiedad de las enzimas denominadas aminoacil-tRNA sintetasas.

•**22.5 Un inhibidor antibiótico de la traducción**. La puromicina es un potente inhibidor de la síntesis de proteínas. Es un análogo del extremo 3′ del aminoacil-tRNA, como se

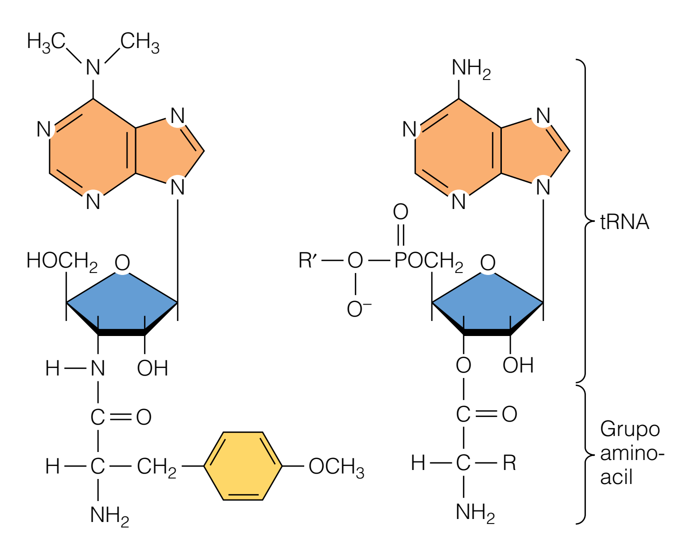


Figura 22.21 La estructura de la puromicina. *Véase* Problema 22.5.

muestra en la Figura 22.21. (La R representa el grupo funcional del aminoácido; R′ representa el resto de la molécula de tRNA.) Cuando se añade puromicina a un sistema acelular que contiene la maquinaria necesaria para la síntesis de proteínas, se libera un polipéptido incompleto de los ribosomas. Cada una de estas cadenas tiene puromicina unida covalentemente.

(a) Explique estos resultados.

(b) ¿A qué extremo del polipéptido esperaría que se uniera la puromicina? Razónelo.

(c) ¿Esperaría que la puromicina se uniese al sitio A, al sitio P o a ambos sitios del ribosoma? Explíquelo.

(d) Asumiendo que penetra en la célula del mismo modo en ambos casos, ¿esperaría que la puromicina fuese mejor inhibidor de la síntesis de proteínas en eucariotas que en procariotas? Razónelo.

•**22.6 Un antibiótico ficticio**. En un estudio con un sistema «in vitro» de síntesis de proteínas en *E.coli*, el polirribonucleótido AUGUUUUUUUUUUUU determina la síntesis de un oligopéptido fMet-Phe-Phe-Phe-Phe. En presencia de rambomicina, un nuevo antibiótico que acaba de ser desarrollado por la compañía farmacéutica Macho, sólo se forma el dipéptido fMet-Phe.

(a) ¿Qué paso de la síntesis del polipéptido inhibe la rambomicina? Explique su respuesta.

(b) ¿Se encontrará el oligopéptido final unido a tRNA tras la reacción no inhibida? ¿Se encontrará el dipéptido unido a tRNA al final de la reacción inhibida por rambomicina? Explíquelo.

22.7 Supresión del cambio de marco de lectura. Como vimos en este capítulo, una mutación sin sentido puede ser suprimida por un tRNA mutante en el que uno de los nucleótidos del anticodón ha cambiado. Describa un mutante tRNA que pueda suprimir una mutación de cambio de marco de lectura. (Pista: un mutante tRNA de este tipo se usó para investigar el papel de la peptidil tRNA en la traslocación del mRNA durante la síntesis de proteínas.)

•**22.8 Plegamiento de proteínas**. El papel de BiP en el plegamiento de proteínas se describió brevemente en este capítulo. Conteste a las siguientes cuestiones sobre observaciones y sucesos que implican a BiP.

(a) BiP se encuentra a altas concentraciones en el lumen del RE pero no está presente en concentraciones significativas en otras localizaciones celulares. ¿Cómo piensa que se establece y mantiene esta situación?

(b) Si el gen que codifica BiP tiene una mutación que afecta al sitio de unión de la proteína en aminoácidos hidrófobos, ¿qué impacto tendrá esto en la célula?

(c) Suponga que se están utilizando técnicas de DNA recombinante para introducir un nuevo gen en una célula y que este gen codifica una subunidad X de una proteína de secreción que está formada por dos tipos de polipéptidos distintos, X e Y. Si el gen que codifica la subunidad Y no está presente en la célula, ¿qué piensas que le sucederá al polipéptido X cuando se produzca?

•**22.9 Exportación cotraslacional**. Usted está llevando a cabo unos experimentos sobre la síntesis de la hormona de la pituitaria prolactina, que es una cadena polipeptídica de 199 aminoácidos. El mRNA que codifica la prolactina se traduce en un sistema acelular que contiene ribosomas, aminoácidos, tRNA, aminoacil-tRNA sintetasas, ATP, GTP y los factores de iniciación, elongación y terminación adecuados. En estas condiciones, se produce una cadena polipeptídica de 227 aminoácidos.

(a) ¿Cómo podría explicar la discrepancia que se observa entre la longitud de la prolactina normal (199 aminoácidos) y la de la prolactina de su experimento (227 aminoácidos)?

(b) En un segundo experimento en el que añade SRP a su sistema, encuentra que el proceso de traducción termina después de que se haya formado un polipéptido de unos 70 aminoácidos. ¿Cómo puede explicar este resultado? ¿Puede hacer alguna propuesta sobre la función de este fenómeno para la célula?

(c) En un tercer experimento, añade tanto SRP como vesículas del RE a su sistema de síntesis, y encuentra que la traducción del mRNA de la prolactina da lugar ahora a un polipéptido de 199 aminoácidos. ¿Cómo puede explicar este resultado? ¿Dónde esperaría encontrar este polipéptido?

22.10 Dos tipos de exportación postraducción. El mecanismo por el que las proteínas sintetizadas en el citosol son exportadas hacia la matriz mitocondrial es distinto del mecanismo por el que las proteínas entran al núcleo, pero ambos tienen características comunes. Por ejemplo, en los dos casos, las proteínas deben atravesar dos membranas. Indique si cada una de las siguientes afirmaciones se puede aplicar al proceso de importación nuclear (Nu), importación mitocondrial (M), a ambos (A) o a ninguno (N). Revise la importación hacia el núcleo del Capítulo 18 antes de contestar a estas preguntas (fíjese especialmente en la Figura 18.30).

(a) El polipéptido que va a trasladarse al orgánulo tiene un corto segmento de aminoácidos que dirige al polipéptido hacia el orgánulo.

(b) La secuencia señal siempre se encuentra en el extremo N-terminal y es cortado por una peptidasa dentro del orgánulo.

(c) La secuencia señal es reconocida, y se une a una proteína receptora de la membrana externa del orgánulo.

(d) Se sabe que la hidrólisis de ATP es necesaria para el proceso de traducción.

(e) Se sabe que la hidrólisis de GTP es necesaria para el proceso de traducción.

(f) Existe una clara evidencia de que hay chaperonas implicadas en el proceso de traslocación de las proteínas.

(g) Las proteínas importadas por un orgánulo entran en su interior a través de una especie de poro proteico.

(h) El complejo del poro consta de muchas proteínas y, con una masa total de más de 100 millones de Da, es lo suficientemente grande como para poder verse al microscopio electrónico.

Bibliografía recomendada

Las referencias con importancia histórica están marcadas con •.

Traducción

Baker, K. E. y R. Parker. Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. Current Opinion Cell Biol. 16 (2004): 293.

Cech, T. R. The ribosome is a ribozyme. Science 289 (2000): 878.

Frank, J. How the ribosome works. American Scientist 86 (1998): 428.

Kapp, L. D. y J. R. Lorsch. The molecular mechanics of eukaryotic translation. Annu. Rev. Biochem. 73 (2004): 657.

Lafontaine, D. L. J. y D. Tollervey. The function and synthesis of ribosomes. Nature Reviews Mol. Cell. Biol. 2 (2001): 514.

Maquat, L. E. Skiing toward nonstop mRNA decay. Science 295 (2002): 2221.

Ramakrishnan, V. Ribosome structure and the mechanism of translation. Cell 108 (2002): 557.

Warner, J. R. y P. M. Knopf. The discovery of polyribosomes. Trends Biochem. Sci. 27 (2002): 376.

Weisblum, B. Back to Camelot: Defining the specific role of tRNA in protein synthesis. Trends Biochem. Sci. 24 (1999): 247.

Plegamiento y procesamiento de proteínas

Aguzzi, A. y C. Haass. Games played by rogue proteins in prion disorders and Alzheimer's disease. Science 302 (2003): 814.

Collinge, J. Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. Annu. Rev. Neurosci. 24 (2001): 519.

Hartl, F. U. y M. Hayer-Hartl. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. Science 295 (2002): 1852.

Paulus, H. Protein splicing and related forms of protein autoprocessing. Annu. Rev. Biochem. 69 (2000): 447.

Prusiner, S. B. Detecting mad cow disease. Sci. Amer. 291 (July 2004): 86.

Smith, B., ed. Nature Insight: Protein Misfolding. Nature 426 (2003): 883-909.

St. George-Hyslop, P. H. Piecing together Alzheimer's. Sci. Amer. 283 (December 2000): 76.

Exportación cotraslacional de proteínas

Anderson, D. y P. Walter. Blobel's Nobel: A vision validated. Cell 99 (1999): 557.

Bibi, E. The role of the ribosome-translocon complex in translation and assembly of polytopic membrane proteins. Trends Biochem. Sci. 23 (1998): 51.

Hegde, R. S. y V. R. Lingappa. Regulation of protein biogenesis at the endoplasmic reticulum membrane. Trends Cell Biol. 9 (1999): 132.

Johnson, A. E. y N. G. Haigh. The ER translocon and retrotranslocation: Is the shift into reverse manual or automatic? Cell 102 (2000): 709.

Matlack, K. E. S., W. Mothes y T. A. Rapoport. Protein translocation: Tunnel vision. Cell 92 (1998): 381.

Matlin, K. S. The strange case of the signal recognition particle. Nature Reviews Mol. Cell. Biol. 3 (2002): 538.

Schnell, D. J. y D. N. Hebert. Protein translocons: Multifunctional mediators of protein translocation across membranes. Cell 112 (2003): 491.

Tsai, B., Y. Ye y T. A. Rapoport. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. Nature Reviews Mol. Cell. Biol. 3 (2002): 246.

Exportación postralacional de proteínas

Chacinska, A., N. Pfanner y C. Meisinger. How mitochondria import hydrophilic and hydrophobic proteins. Trends Cell Biol. 12 (2002): 299.

Pilon, M. y R. Schekman. Protein translocation: How Hsp70 pulls it off. Cell 97 (1999): 679.

Rehling, P., K. Brandner y N. Pfanner. Mitochondrial import and the twin-pore translocase. Nature Reviews Mol. Cell Biol. 5 (2004): 519.

Soll, J. y E. Schleiff. Protein import into chloroplasts. Nature Reviews Mol. Cell Biol. 5 (2004): 198.

Teter, S. A., and D. J. Klionsky. How to get a folded protein across a membrane. Trends Cell Biol. 9 (1999): 428.

23

La regulación de la expresión génica

En el estudio que hemos llevado a cabo hasta ahora del flujo de información biológica, hemos identificado al DNA como el principal almacén de información de las células, hemos visto cómo se replica y cuáles son los pasos implicados en la expresión de la información genética del DNA por medio de la transcripción y la traducción. Para concluir esta exposición sobre el flujo de información, examinaremos las estrategias utilizadas por las células para regular la expresión de sus genes.

La regulación es una parte importante de casi todos los procesos de la naturaleza. En pocas ocasiones es adecuado describir un proceso enumerando simplemente sus pasos. En lugar de ello, debemos preguntarnos qué es lo que activa un proceso, qué es lo que hace que finalice y qué determina la tasa de cambio entre la activación y la desactivación. Esto es especialmente necesario para el proceso de la expresión génica. La mayor parte de los genes no se están expresando constantemente. En algunos casos, la expresión selectiva de los genes permite a las células economizar metabólicamente, sintetizando sólo aquellos productos que van a usarse inmediatamente en función de las condiciones ambientales prevalentes; ésta suele ser la situación más común en bacterias. En otros casos, como en los organismos pluricelulares, la expresión selectiva de genes permite a las células desempeñar funciones especiales.

Como se puede imaginar, los primeros estudios sobre la regulación de la expresión génica se hicieron en procariotas. Las bacterias son mucho más adecuadas para las manipulaciones genéticas y bioquímicas, que caracterizaron a los primeros estudios sobre los mecanismos de control de genes. Sin embargo, en los últimos años, los avances en la tecnología del DNA han permitido un mayor progreso en el estudio de este proceso en eucariotas. Estudiaremos primero el proceso en procariotas y veremos lo más destacado sobre los mecanismos de control génico descubierto en estos organismos, analizando después el proceso en eucariotas.

Regulación génica en procariotas

De los varios miles de genes presentes en una célula bacteriana típica, algunos son tan importantes para la vida de la célula que deben estar siempre activos; su expresión no está regulada. Entre estos **genes constitutivos** se incluyen, por ejemplo, los genes que codifican las enzimas de la glucolisis. Sin embargo, para muchos otros genes la expresión está regulada de forma que la cantidad final de producto del gen —proteína o RNA— está cuidadosamente ajustada a las necesidades de la célula. Algunos de estos **genes regulados** codifican enzimas de procesos metabólicos que, a diferencia de la glucolisis, no se requieren constantemente. Una forma de regular las concentraciones intracelulares de estas enzimas es activando y desactivando la transcripción en respuesta a las necesidades celulares. Dado que este control de los genes que codifican enzimas ayuda a las células bacterianas a adaptarse a su ambiente, se suele a hacer referencia a este proceso como **síntesis enzimática adaptativa**.

Las rutas catabólica y anabólica están reguladas por inducción y represión respectivamente

Las bacterias utilizan estrategias algo distintas para regular la síntesis enzimática, dependiendo de si la enzima está implicada en una ruta *catabólica* (degradativa) o *anabólica*

(sintética). Las enzimas que catalizan estas rutas suelen estar reguladas coordinadamente; es decir, la síntesis de todas las enzimas implicadas en una ruta concreta se activan o desactivan al mismo tiempo. Aquí describiremos brevemente dos rutas bien conocidas, una catabólica y una anabólica.

Rutas catabólicas e inducción por sustrato. Las enzimas catabólicas existen con la función principal de degradar sustratos específicos, normalmente como modo de obtención de energía. La Figura 23.1 representa los pasos de la ruta catabólica que degrada el disacárido lactosa en azúcares sencillos que pueden ser posteriormente hidrolizados en la glucolisis. El paso central de esta ruta es la hidrólisis de lactosa en los monosacáridos glucosa y galactosa, reacción catalizada por la enzima *β-galactosidasa*. Sin embargo, la lactosa debe ser transportada primero hasta la célula. Una proteína denominada *galactosido permeasa* es la responsable de este transporte, y su síntesis está regulada coordinadamente con la β-galactosidasa.

Dado que la función de una enzima catabólica es degradar un sustrato específico, estas enzimas son necesarias sólo cuando la célula está expuesta al sustrato. La enzima β-galactosidasa, por ejemplo, es útil sólo cuando las células tienen acceso a lactosa; en ausencia de lactosa, la enzima es superflua. Así, tiene sentido en términos de economía celular que la síntesis de β-galactosidasa se active, o *induzca*, en presencia de lactosa pero se inhiba en su ausencia. Esta activación de la síntesis enzimática se denomina **inducción por sustrato**, y las enzimas cuya síntesis está regulada de esta forma se conocen como **enzimas inducibles**. La mayor parte de las células bacterianas están sujetas a la inducción por sustrato de sus enzimas.

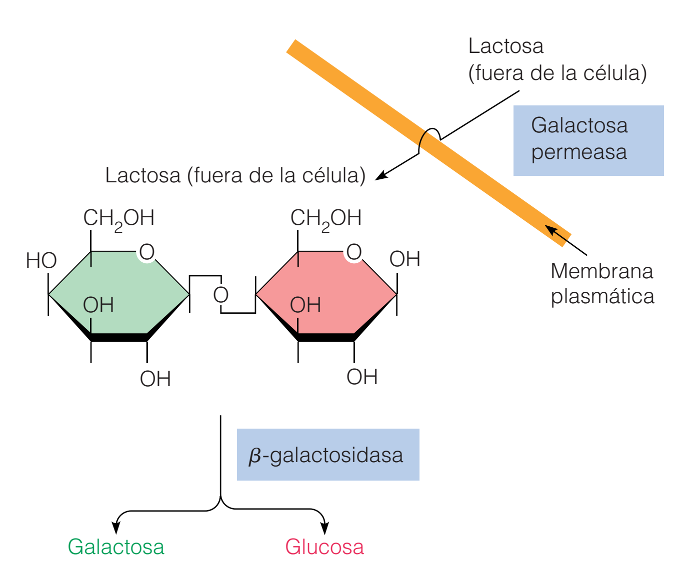


Figura 23.1 Ruta catabólica típica. La degradación del disacárido lactosa implica enzimas (recuadradas en azul) cuya síntesis está regulada coordinadamente. Observe en las Figuras 23.3 y 23.4 la organización y regulación de los genes que codifican estas enzimas. (Las enzimas responsables del catabolismo posterior de los monosacáridos glucosa y galactosa no son parte de esta unidad reguladora.)

Rutas anabólicas y represión por producto final. La regulación de las rutas anabólicas es, en cierto sentido, la opuesta a la de las rutas catabólicas. La Figura 23.2 resume la ruta anabólica de síntesis del aminoácido triptófano a partir del compuesto inicial corismato. Las enzimas que catalizan los seis pasos de esta ruta, como las implicadas en los dos primeros pasos del catabolismo de la lactosa, están reguladas coordinadamente a nivel génico.

En las rutas anabólicas, la cantidad de enzima producida por la célula suele estar relacionada inversamente con la concentración intracelular del producto final de la ruta. Esta relación tiene sentido. Por ejemplo, a medida que

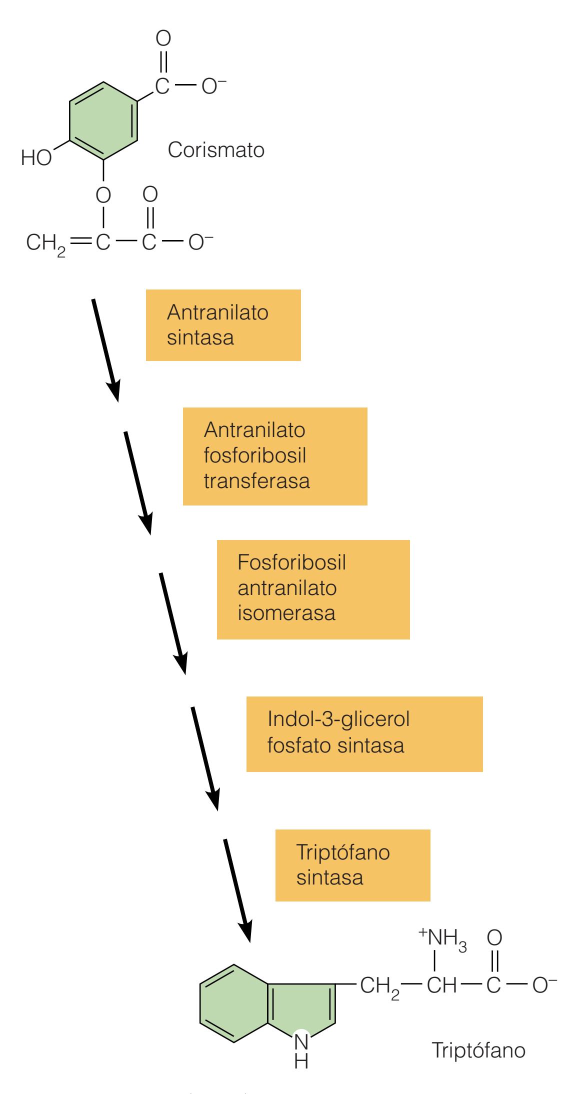


Figura 23.2 Ruta anabólica típica. La síntesis del aminoácido triptófano a partir del compuesto inicial corismato implica a un conjunto de enzimas (recuadradas en dorado) cuya síntesis está regulada coordinadamente. *Véase* en la Figura 23.6 la organización y regulación de los genes que codifican estas enzimas.

aumenta la concentración de triptófano, es ventajoso para la célula economizar en sus recursos, reduciendo la producción de las enzimas implicadas en la síntesis de triptófano. Pero es igualmente importante que la célula sea capaz de activar la producción de estas enzimas cuando el nivel de triptófano caiga de nuevo. Este tipo de control es posible gracias a la capacidad que tiene el producto final de una ruta anabólica —en nuestro ejemplo, el triptófano— de *reprimir* (reducir o parar) de alguna manera la producción de las enzimas implicadas en su formación. Esta reducción en la expresión de los genes que codifican la enzima se denomina **represión por producto final**. La mayoría de las rutas biosintéticas de las células bacterianas están reguladas de esta forma. *Represión* es el término general de la genética molecular para referirse a la reducción de la expresión de cualquier gen regulado.

La verdadera represión génica siempre tiene un efecto en la *síntesis*, no sólo en la *actividad* de la proteína. Recuerde del Capítulo 6 que los productos finales de las rutas biosintéticas suelen tener un efecto inhibitorio también sobre la actividad enzimática. Esta *inhibición por retroalimentación* difiere de la represión tanto en el mecanismo como en el resultado final. En la inhibición por retroalimentación, las moléculas de la enzima están todavía presentes pero su actividad catalítica está inhibida; en la represión por producto final, las enzimas ni siquiera se han sintetizado.

Moléculas efectoras. Una característica común de la inducción y de la represión de la síntesis enzimática es que el control se ejerce a nivel genético en ambos casos. Otra característica que comparten es que este control se ejerce mediante pequeñas moléculas orgánicas presentes en la célula o en sus alrededores. Los genetistas llaman a estas pequeñas moléculas **efectores**. Como veremos brevemente, los efectores inducen cambios conformacionales en las enzimas alostéricas que controlan la expresión de los genes. En las rutas catabólicas, los efectores suelen ser sustratos (la lactosa, en nuestro ejemplo), y funcionan como inductores de la expresión génica y, por lo tanto, de la síntesis enzimática. En las rutas anabólicas los efectores suelen ser productos finales (el triptófano, en nuestro ejemplo) y normalmente producen una represión de la expresión génica y por lo tanto de la síntesis enzimática.

Los genes implicados en el catabolismo de la lactosa están organizados en un operón inducible

En la bacteria *Escherichia coli* se da el típico ejemplo de un sistema enzimático inducible, que implica a un conjunto de enzimas del catabolismo de la lactosa —las enzimas que catalizan los pasos que se muestran en la Figura 23.1—. La mayoría de lo que sabemos sobre la regulación de la expresión génica en bacterias, incluido el vocabulario que se utiliza para expresar ese conocimiento, está basado en los estudios pioneros en este sistema, llevados a cabo por François Jacob y Jacques Monod. En 1961 estos investigadores publicaron un artículo científico que ha tenido más influencia en nuestro conocimiento de la regulación génica que cualquier otro.

En su trabajo, Jabob y Monod propusieron un modelo general de regulación con implicaciones de largo alcance. El fundamento de este modelo se basó en su descubrimiento de que el catabolismo de la lactosa implica a dos tipos de genes: los primeros son genes que codifican enzimas implicadas en la obtención de lactosa y su metabolismo, y el segundo es un gen regulador cuyo producto controla la actividad del primer conjunto de enzimas. Los genes implicados en el metabolismo de la lactosa son (1) el gen *lacZ*, que codifica la β-galactosidasa, la enzima que hidroliza la lactosa y otras β-galactosidasas; (2) el gen *lacY*, que codifica la galactósido permeasa, la proteína de membrana que transporta la lactosa a la célula; y (3) el gen *lacA*, que codifica una transacetilasa que añade un grupo acetilo a la lactosa cuando es tomada por la célula. Los genes lacZ, *lac*Y y *lac*A se encuentran muy próximos en el cromosoma bacteriano y se expresan sólo cuando está presente un inductor como la lactosa. En conjunto, estas observaciones llevaron a Jacob y Monod a sugerir que los tres genes pertenecían a una única unidad reguladora, o como ellos lo llamaron, un **operón**, es decir, un grupo de genes con funciones relacionadas que están agrupados con secuencias de DNA que permiten que estos genes sean activados y desactivados simultáneamente.

La organización de genes funcionalmente relacionados en operones es común en procariotas pero no células eucariotas. Sin embargo, el modelo del operón estableció principios generales básicos que han determinado nuestro conocimiento de la regulación transcripcional, tanto en sistemas procariotas como eucariotas.

El represor *lac* es una proteína alostérica cuya unión al DNA está controlada por lactosa

Una característica clave del modelo del operón es la idea de que los genes con funciones metabólicamente relacionadas están agrupados y que su transcripción está regulada como una única unidad. Pero, ¿cómo se produce esta regulación? Jacob y Monod abordaron esta cuestión estudiando la capacidad que tienen los inductores como la lactosa para activar la producción de enzimas implicadas en el metabolismo de la lactosa. Encontraron que para que se dé la inducción, debe estar presente un gen adicional —un gen regulador denominado *lacI* (por inducción)—. Mientras las bacterias normales producirán β-galactosidasa, galactosido permeasa y transacetilasa sólo cuando un inductor está presente, la deleción del gen *lacI* hace que las células produzcan siempre estas proteínas, incluso cuando el inductor está ausente. Jacob y Monod concluyeron así que el gen *lacI* codifica un producto que normalmente inhibe, y por lo tanto regula, la expresión de los genes *lacZ*, *lacY*

y *lacA*. El producto de un gen regulador que inhibe la expresión de otros genes se denomina **proteína represora**.

Para comprender cómo puede un represor regular la expresión génica, necesitamos fijarnos bien en la organización de los genes implicados en el metabolismo de la lactosa. Como se muestra en la Figura 23.3, el **operón *lac*** consta de los genes *lacZ*, *lacY* y *lacA* precedidos por un **promotor** (P_{lac}) y una secuencia especial de nucleótidos denominada **operador** (*O*) que, de hecho, solapa con el promotor. La transcripción del operón *lac* empieza en el promotor, que es el sitio de anclaje de la RNA polimerasa y continúa con el operador y los genes *lacZ, lacY y lacA* hasta que finalmente termina en una secuencia de terminación. El resultado neto es una sola molécula de mRNA que codifica los productos polipeptídicos de los tres genes. Estas moléculas de mRNA, que codifican más de un polipéptido, se denominan **mRNAs policistrónicos**; sólo se encuentran en células procariotas.

La ventaja de agrupar genes relacionados en un operón para la transcripción de un solo mRNA policistrónico es que permite que la síntesis de varios polipéptidos esté controlada en un solo paso. El paso crucial en el control es la interacción entre un operador del DNA y una proteína represora. En la Figura 23.4 se representa la interacción entre estos elementos en el caso concreto del operón *lac*. La proteína represora, denominada *represor lac*, está codificada por el gen regulador *lacI*, que se localiza fuera del operón (aunque al estar junto al operón *lac*, lo regula). El represor *lac* es una proteína de unión al DNA que reconoce y se une específicamente al operador del operón *lac*. Cuando el represor está unido al operador (Figura 23.4a), la RNA polimerasa está bloqueada en su movimiento por detrás del operón *lac*, y por lo tanto no puede transcribir los genes *lacZ, lac Y* y *lacA*. En otras palabras, la unión del represor al operador mantiene apagados a los genes del operón.

Si la unión del represor al operador bloquea la transcripción, ¿cómo activan la transcripción del operón *lac* las células, en presencia de inductores como la lactosa? La respuesta es que las moléculas inductoras se unen al represor *lac*, alterando su conformación de forma que el represor ya no pueda unirse al operador en el DNA. Sin el represor unido, el operador está desocupado y la RNA polimerasa puede unirse al promotor y acceder al operón, transcribiendo los genes *lacZ, lacY* y *lacA* a una sola molécula de mRNA policistrónico (Figura 23.4b).

Una característica crucial de la proteína represora es, asimismo, su capacidad para presentarse de dos formas, de las que sólo una se une al operador. En otras palabras, un represor es una *proteína alostérica.* Como vimos en el Capítulo 6, una proteína alostérica puede existir en dos estados conformacionales, dependiendo de si la molécula efectora está o no presente. En un estado la proteína es activa; en el otro estado es total o parcialmente inactiva. Cuando una molécula efectora se une a la proteína, induce un cambio en el estado conformacional de la proteína y por lo tanto en su actividad. Sin embargo, la unión es reversible y la salida del efector se traduce en una rápida vuelta de la proteína a la forma alternativa.

La Figura 23.5 muestra la interaccion reversible del represor *lac* con su efector, que de hecho no es la lactosa propiamente dicha, sino la *alolactosa*, un isómero de la lactosa producido tras la entrada de la lactosa en la célula. El estado conformacional que asume el represor en ausencia de alolactosa reconoce y se une al operador (inhibiendo así la transcripción), mientras que la forma que tiene unida alolactosa no lo hace. El resultado es que la proteína represora inhibe la transcripción del operón *lac* en ausencia de alolactosa, cuando no es necesario producir las enzimas catabólicas codificadas por el operón *lac*. Sin embargo, en presencia de alolactosa, el represor se convierte en su forma inactiva, que no reconoce al operador y por lo tanto no evi-

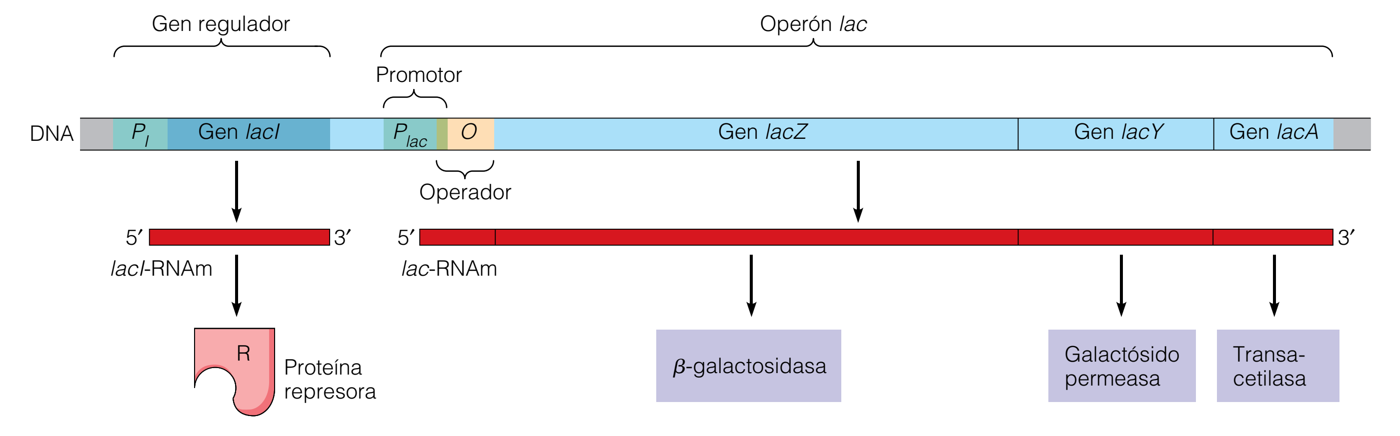


Figura 23.3 Operón lactosa (*lac*) de *E. coli*. El operón lac consta de un segmento de DNA que incluye tres genes contiguos (*lacZ, lacY* y *lacA*), que son transcritos y regulados coordinadamente. El gen regulador *lacI*, situado cerca del operador codifica la proteína represora R. Tanto los genes reguladores como los genes del operón *lac*, contienen promotores (P_I y P_{lac}, respectivamente) a los que se une la RNA polimerasa, y terminadores que paran la transcripción. P_{lac} solapa con el operador al que se une la forma activa de la proteína represora. El operón se transcribe en una sola molécula de mRNA que codifica los tres polipéptidos. Para detalles de la regulación, *véase* la Figura 23.4.

RNA polimerasa bloqueada para la transcripción del operón *lac*
Represor unido a un operador
DNA P_I Gen *lacI* O Gen *lacZ* Gen *lacY* Gen *lacA*
R
5′ 3′
lacI-RNAm
R
Forma activa del represor

(a) Ausencia de lactosa, unión del represor al operador, operador reprimido

RNA polimerasa unida al promotor
RNA polimerasa transcribiendo el operón
DNA P_I Gen *lacI* P_{lac} O Gen *lacZ* Gen *lacY* Gen *lacA*
5′ 3′ 5′
lacI-RNAm
lac-RNAm
R
Lactosa
R
L
L
Forma inactiva del represor
β-galactosidasa
Galactósido permeasa
Transa-cetilasa

(b) Presencia de lactosa, represor no unido al operador, operón *lac*

Figura 23.4 Regulación del operón *lac*. La transcripción del operón *lac* está regulada por la unión del represor *lac* (R) al operador. (**a**) En ausencia de lactosa, el represor permanece unido al operador y la RNA polimerasa no puede moverse hacia el operón lac y por lo tanto no puede transcribir sus genes. (**b**) En presencia de lactosa, el represor se convierte en su forma inactiva, que no se une al operador. La RNA polimerasa puede unirse así por detrás del operador y transcribir los genes *lacZ, lacY* y *lacA* a un solo mRNA policistrónico. La forma de la lactosa que se une al represor es un isómero llamado alolactosa (L).

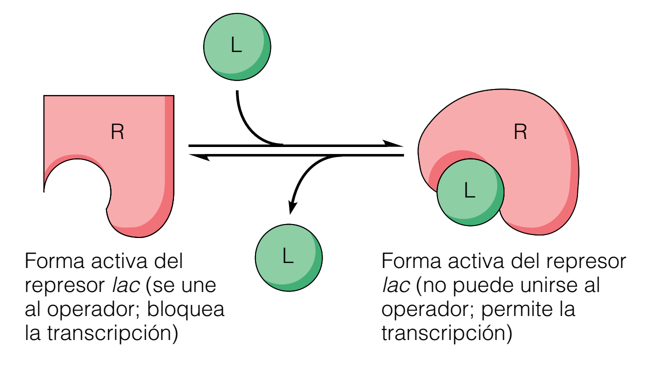


Figura 23.5 Regulación alostérica del represor *lac*. El represor *lac* (R) es una proteína alostérica, capaz de convertirse, de forma reversible, en dos conformaciones alternativas. En ausencia del efector alolactosa (L), la proteína asume la forma que es inactiva para la unión al operador *lac*. En presencia del efector, la proteína existe fundamentalmente en un estado conformacional alternativo, que no reconoce el operador y es, por lo tanto, inactiva como represor de la transcripción.

ta que la RNA polimerasa transcriba los genes *lac*. De esta forma, la lactosa dispara la inducción de las enzimas codificadas por el operón *lac*. Dado que el operón *lac* está desactivado a no ser que sea inducido, se dice que es un **operón inducible**. Adoptando un término informático, el «estado por defecto» de un operón inducible es el de apagado.

Los estudios con bacterias mutantes revelaron cómo está organizado el operón *lac*

La mayoría de los experimentos que condujeron al planteamiento del modelo del operón fueron análisis genéticos de bacterias mutantes que producían cantidades anormales de las enzimas del operón *lac* o que mostraban respuestas anormales a la adición o eliminación de lactosa. Estas mutaciones se encontraban localizadas en los genes del operón (*lacZ, lacY* o *lacA*) o bien en los elementos reguladores del sistema (O, P_{lac} o *lacI*). Los dos tipos de mutacio-

nes se pueden distinguir porque las alteraciones en un gen del operón afectan sólo a una proteína concreta, mientras que las mutaciones en las regiones reguladoras afectan normalmente a la expresión de todos los genes del operador coordinadamente.

La Tabla 23.1 resume estas mutaciones y sus fenotipos, empezando en la línea 1 con el fenotipo inducible de la célula salvaje (no mutada). Los signos *más* de las columnas del fenotipo de la tabla indican altos niveles enzimáticos. Los signos *menos* indican niveles enzimáticos muy bajos, aunque no el cese total de la actividad enzimática. Incluso en ausencia de lactosa, las células no mutadas sintetizan pequeñas cantidades de las enzimas *lac* porque la unión del represor al operador es reversible —el represor activo ocasionalmente se «desprende» del operador—. Este bajo nivel basal resultante es importante porque permite a las células producir la cantidad suficiente de galactósido permeasa para facilitar el transporte inicial de moléculas de lactosa al interior de la célula antes de la inducción del operón *lac*.

Los experimentos como los representados en la Tabla 23.1, se suelen llevar a cabo usando como inductor al β-galactósido *isopropiltiogalactosido* (IPTG) en lugar de lactosa o alolactosa. El IPTG es un buen inductor del sistema, pero no puede ser metabolizado por la célula, de manera que su utilización evita las posibles complicaciones de los variables niveles de efector causados por su catabolismo. Siguiendo la nomenclatura más común, ahora podemos definir formalmente el término **inductor** para referirnos a cualquier molécula efectora que active la transcripción de un operón inducible. Pero recuerde que un inductor no es exactamente lo «opuesto» a un represor, como puede parecer a primera vista. Un inductor es una molécula pequeña que se une a una proteína; un represor es una proteína que se une a DNA.

La Tabla 23.1 puede ayudar a clarificar cómo el análisis genético de fenotipos condujo a Jacob y Monod a formular el modelo de regulación génica del operón. Consideraremos de nuevo cada uno de los seis tipos de mutaciones que se muestran en las líneas 2-7 de esta tabla; cuando lo hagamos, debería ser capaz de ver cómo contribuyó cada tipo de mutación a la formulación del modelo del operón.

Mutaciones en los genes del operón. Las mutaciones en los genes *lac*Z o *lac*Y pueden llevar a la producción de enzimas alteradas con poca o ninguna actividad biológica, incluso en presencia de inductor (Tabla 23.1, líneas 2 y 3). Estas mutaciones son, por tanto, incapaces de utilizar lactosa como fuente de carbono, bien porque no pueden transportar lactosa de forma eficiente al interior de la célula (mutantes Y^-), bien porque no pueden romper el enlace glicosídico entre la galactosa y la glucosa que forman la lactosa (mutantes Z^-).

Mutaciones en el operador. Las mutaciones en el operador pueden producir un fenotipo constitutivo; es decir, las células mutantes producen continuamente las enzimas *lac*, tanto si el inductor está presente como si no lo está (Tabla 23.1, línea 4). Estas mutaciones cambian la secuencia de bases del operador del DNA de manera que ya no puede ser reconocida por el represor. El genotipo de estos *mutantes constitutivos de operador* se representa como O^c. Como se espera de las mutaciones en un sitio de regulación, las O^c afectan simultáneamente a la síntesis de las tres enzimas *lac* de la misma forma.

Mutaciones en el promotor. Las mutaciones en el promotor pueden disminuir la afinidad de la RNA polimerasa por el promotor. Como resultado, se unen menos moléculas de RNA polimerasa por unidad de tiempo al promotor y disminuye la tasa de producción de mRNA. (Sin embargo, una vez que la molécula de RNA polimerasa se une al DNA y empieza la transcripción, la molécula de mRNA se elonga a una tasa normal). Normalmente, las mutaciones en el promotor (P^-) del operón *lac* disminuyen, tanto las elevadas concentraciones de enzima producidas en presencia de inductor, como el de por sí bajo nivel basal de producción de enzimas *lac* de la célula, en ausencia de inductor (Tabla 23.1, línea 5).

Tabla 23.1 Análisis genético de mutaciones que afectan al operón *lac*

		Fenotipo en ausencia de inductor		Fenotipo en presencia de inductor	
Número de línea	Genotipo de la bacteria*	β-galactosidasa	Permeasa	β-galactosidasa	Permeasa
1	$I^+P^+O^+Z^+Y^+$	−	−	+	+
2	$I^+P^+O^+Z^+Y^-$	−	−	+	−**
3	$I^+P^+O^+Z^-Y^+$	−	−	−	+
4	$I^+P^+O^cZ^+Y^+$	+	+	+	+
5	$I^+P^-O^+Z^+Y^+$	−	−	−	−
6	$I^sP^+O^+Z^+Y^+$	−	−	−	−
7	$I^-P^+O^+Z^+Y^+$	+	+	+	+

* $P = P_{lac}$
** La permeasa deficiente presenta suficiente actividad biológica como para transportar cantidades mínimas de lactosa a la célula, permitiendo así la inducción del operón *lac*.

Mutaciones en genes reguladores. Las mutaciones en el gen *lacI* son de dos tipos. Algunos mutantes no pueden producir ninguna de las enzimas *lac*, independientemente de si el inductor está presente, y por lo tanto se denominan *mutantes súper-represores* (I^s en la Tabla 23.1, línea 6). La molécula represora en estos mutantes ha perdido su capacidad de reconocer y unirse al inductor pero todavía puede reconocer al operador, o bien tiene alta afinidad por el operador aunque el inductor no esté unido a él. En cada caso, el represor se une fuertemente al operador y reprime la transcripción y, en consecuencia, la síntesis enzimática, bajo cualquier condición.

El resto de las mutaciones *lacI* implican la síntesis de una proteína represora mutante que no reconoce al operador (o, en algunos casos, ni siquiera se sintetiza). El operón *lac* en estos mutantes I^- no puede desactivarse y por lo tanto las enzimas se sintetizan constitutivamente (Tabla 23.1, línea 7).

Los mutantes I^-, junto con los mutantes O^c y P^-, ilustran la importancia del reconocimiento específico de la secuencia de bases de DNA por las proteínas reguladoras durante el control de la transcripción génica. Un pequeño cambio —tanto en la secuencia de DNA del promotor u operador, como en la proteína reguladora— puede afectar profundamente a la expresión de todos los genes del operón.

El ensayo *cis-trans* usando una bacteria parcialmente diploide. La existencia de dos tipos distintos de mutantes constitutivos, O^c e I^-, planteó la cuestión de cómo podrían distinguirse uno del otro. El **ensayo cis-trans** suele utilizarse para diferenciar entre mutaciones que actúan en *cis*, y que afectan a sitios del DNA (por ejemplo, O^c) y mutaciones que actúan en *trans*, que afectan a proteínas (por ejemplo I^-). La base del ensayo *cis-trans* es una célula (u organismo) que tiene dos copias distintas de un segmento de DNA de interés. Como sabemos, *E. coli* suele ser haploide, pero Jacob y Monod construyeron una bacteria parcialmente diploide insertando una segunda copia de la porción lac del genoma bacteriano en el plásmido del factor-F de células F^+ (página 000). Esta segunda copia podía ser transferida por conjugación en una bacteria hospedadora de cualquier genotipo *lac* de interés para crear células parcialmente diploides como las que se muestran en la Tabla 23.2.

Si sólo una de las copia del operón contiene una mutación reguladora I^- u O^c, puede determinarse si la mutación tiene efecto en las dos copias del operón o sólo en la copia del operón donde está localizada. Se dice que la mutación actúa en *cis* si los únicos genes afectados son aquellos que están físicamente unidos al locus mutante (*cis* significa «en este lado», refiriéndose en este caso a una mutación cuya influencia está restringida a genes localizados en la misma copia física que el operón *lac*). Por el contrario, se dice que una mutación actúa en trans si están afectados los genes de ambas copias del operón (*trans* significa «en el otro lado» y en este caso hace referencia a la capacidad de la mutación de afectar de alguna manera a la otra copia del operón *lac*).

Para determinar qué copia del operón *lac* está siendo expresada en una población celular dada, Jacob y Monod usaron células parcialmente diploides que contenían una copia del operón *lac* con un gen *Z* deficiente y la otra copia con un gen *Y* deficiente. La Tabla 23.2 muestra lo que sucede si una de estas copias del operón *lac* tiene un alelo I^- deficiente y el otro tiene un alelo I^+ normal. En estas células, tanto la β-galactosidasa como la permeasa son enzimas inducibles, incluso aunque el gen funcional de una de estas enzimas (el alelo Z^+ de la β-galactosidasa) esté físicamente unido al gen *I* deficiente (Tabla 23.2, línea 3). Ahora sabemos que esto sucede porque el único gen *I* funcional presente en la célula produce moléculas de represor activo, que difunden hacia el citosol y se unen a ambos operadores en ausencia de lactosa. Así, se dice que el represor es un **factor que actúa en *trans***.

Con los diploides parciales que contenían los dos alelos O^c y O^+ se obtuvieron resultados bastante distintos (Tabla 23.2, línea 4). En este caso, los genes unidos al alelo O^c son transcritos constitutivamente (Z^+Y^-), mientras que aquéllos unidos al alelo no mutado eran inducibles (Z^-Y^+). En otras palabras, el locus *O* actúa en *cis*; afecta sólo al comportamiento de genes del operón del que forma parte físicamente. Esta especificidad en *cis* es característica de mutaciones que afectan a sitios de unión a DNA, más que a las proteínas producto de estos genes. Al igual que

Tabla 23.2 Análisis de diploides en mutaciones que afectan al operón *lac*

		Fenotipo en ausencia de inductor		Fenotipo en presencia de inductor	
Número de línea	Genotipo de la bacteria diploide*	β-galactosidasa	Permeasa	β-galactosidasa	Permeasa
1	$I^+P^+O^+Z^+Y^+/I^+P^+O^+Z^+Y^+$	−	−	+	+
2	$I^+P^+O^+Z^-Y^+/I^+P^+O^+Z^+Y^-$	−	−	+	+
3	$I^+P^+O^+Z^-Y^+/I^-P^+O^+Z^+Y^-$	−	−	+	+
4	$I^+P^+O^+Z^-Y^+/I^+P^+O^cZ^+Y^-$	+	−	+	+
5	$I^-P^+O^+Z^-Y^+/I^sP^+O^+Z^+Y^-$	−	−	−	−

* $P = P_{lac}$

otras secuencias de DNA no codificantes implicadas en el control de la expresión génica, se dice que el sitio *O* es un **elemento que actúa en *cis*.**

Los genes implicados en la síntesis de triptófano están organizados en un operón reprimible

Aunque la mayor parte del trabajo que condujo a la formulación del concepto de operón implicó al operón *lac* de *E. coli*, hoy se conocen distintos sistemas reguladores bacterianos con el mismo patrón general —es decir, los genes que codifican enzimas de una determinada ruta metabólica están agrupados en un conjunto que funciona como una unidad de transcripción y regulación—. Normalmente están implicados uno o más operadores, promotores y genes reguladores, aunque existe la suficiente variabilidad entre un operón y otro como para poder hacer demasiadas generalizaciones.

Los operones que codifican enzimas implicadas en rutas catabólicas generalmente se asemejan al operón *lac* en que son inducibles; es decir, son activados por un efector alostérico específico, normalmente el sustrato de la ruta catabólica. Por el contrario, los operones que regulan enzimas implicadas en rutas anabólicas (biosintéticas) son **operones reprimibles**; son inactivados alostéricamente, normalmente por un efector que es el producto final de la ruta. El operón triptófano (*trp*) es un buen ejemplo de operón reprimible (Figura 23.6). El **operón *trp*** contiene los genes que codifican las enzimas que catalizan las reacciones implicadas en la biosíntesis de triptófano, así como las secuencias de DNA necesarias para regular la producción de estas enzimas. La molécula efectora en este caso es el producto final de la ruta biosintética, es decir, el aminoácido triptófano.

La expresión de las enzimas producidas por el operón *trp* está reprimida en presencia de triptófano (Figura 23.6a) y no reprimida en su ausencia (Figura 23.6b). Así, a diferencia del sistema *lac*, el gen regulador de este operón, denominado *trpR*, codifica una proteína represora alostérica que es activa (se une al DNA operador) cuando el efector está unido a ella y es inactiva en su forma libre. El efector en estos sistemas (el triptófano en este caso) se conoce a veces como **correpresor**, porque es requerido, junto con la proteína represora, para desactivar la transcripción del operón.

Los operones *lac* y *trp* ilustran el control transcripcional negativo

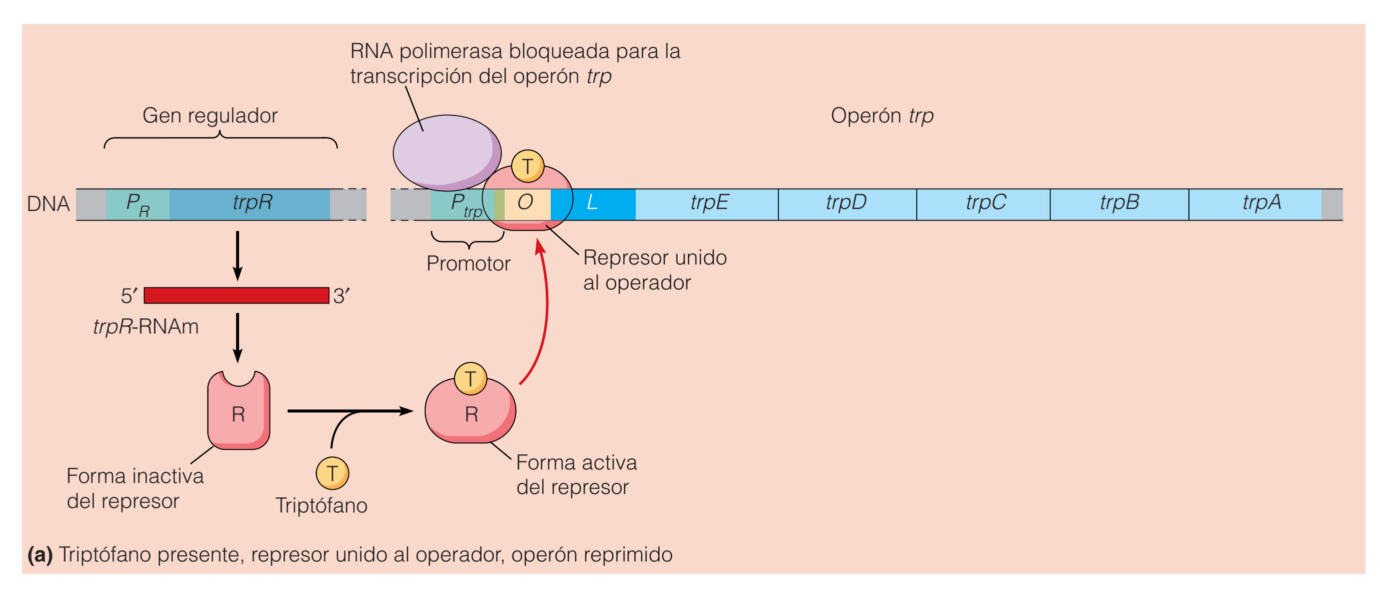
Como hemos visto, las proteínas represoras pueden controlar la transcripción de genes implicados en las rutas anabólicas o catabólicas; en la rutas catabólicas, la forma activa (de unión a DNA) del represor es la proteína represora *libre de efector*, mientras que en las rutas anabólicas, la forma activa es la proteína represora *unida a efector*. Pero independientemente de cuál sea la forma activa del represor, el efecto de la acción represora es siempre el mismo: el represor activo evita la transcripción del operador bloqueando el desplazamiento de la RNA polimerasa por el DNA. En otras palabras, los represores nunca activan nada; su efecto es siempre desactivar la expresión de genes específicos (o mantenerlos desactivados). Por lo tanto, éste es un sistema de **control negativo**, en el que la forma activa del represor funciona inhibiendo la transcripción génica.

La represión catabólica ilustra el control positivo de la transcripción

A diferencia de las situaciones que acabamos de describir, la transcripción de algunos operones está bajo **control positivo**, lo que significa que la forma activa de una proteína reguladora clave *activa* la expresión del operón. Un importante ejemplo de control transcripcional positivo lo encontramos en la **represión catabólica**, que se refiere a la capacidad de la glucosa para inhibir la síntesis de enzimas catabólicas producidas por operones bacterianos inducibles. Para comprender este fenómeno, tenemos que recordar que la glucosa es la fuente de energía preferida de casi todas las células procariotas (y también de casi todas las eucariotas). Esto se debe a que las enzimas de la ruta glucolítica y de los ácidos tricarboxílicos (TCA) son constitutivas en la mayoría de las células, de manera que la glucosa puede ser catabolizada en cualquier momento sin la síntesis de enzimas adicionales. Y aunque otras moléculas distintas de la glucosa pueden ser metabolizadas como fuentes de energía, la represión catabólica garantiza que el resto de las fuentes de carbono sólo se utilizan cuando no hay glucosa disponible. Por ejemplo, *E. coli*, que crece tanto en presencia de glucosa como de lactosa, usa preferentemente la glucosa y tiene niveles muy bajos de enzimas codificadas por el operón lac, a pesar de la presencia de inductor para ese operón.

Como los otros mecanismos reguladores que hemos visto, este uso preferencial de la glucosa es posible gracias a un mecanismo de control génico que implica una proteína alostérica reguladora y una pequeña molécula efectora. La verdadera molécula efectora que controla la expresión génica no es la glucosa, sino una señal secundaria que refleja el nivel de glucosa de la célula. Esta señal secundaria es una forma de AMP denominada **AMP cíclico** o **cAMP** (*véase* Figura 14.6). La glucosa actúa inhibiendo directamente la adenilil ciclasa, la enzima que cataliza la síntesis de cAMP a partir de ATP. Cuanta más glucosa esté presente, menos cAMP se sintetiza.

¿Cómo influye el cAMP a la expresión génica? Como otros efectores, actúa uniéndose a una proteína reguladora alostérica (Figura 23.7a). En este caso, la proteína reguladora, denominada **proteína receptora de cAMP (CRP)**, es una proteína activadora de la transcripción. CRP no es en sí funcional, pero unida a cAMP, CRP cambia a su forma



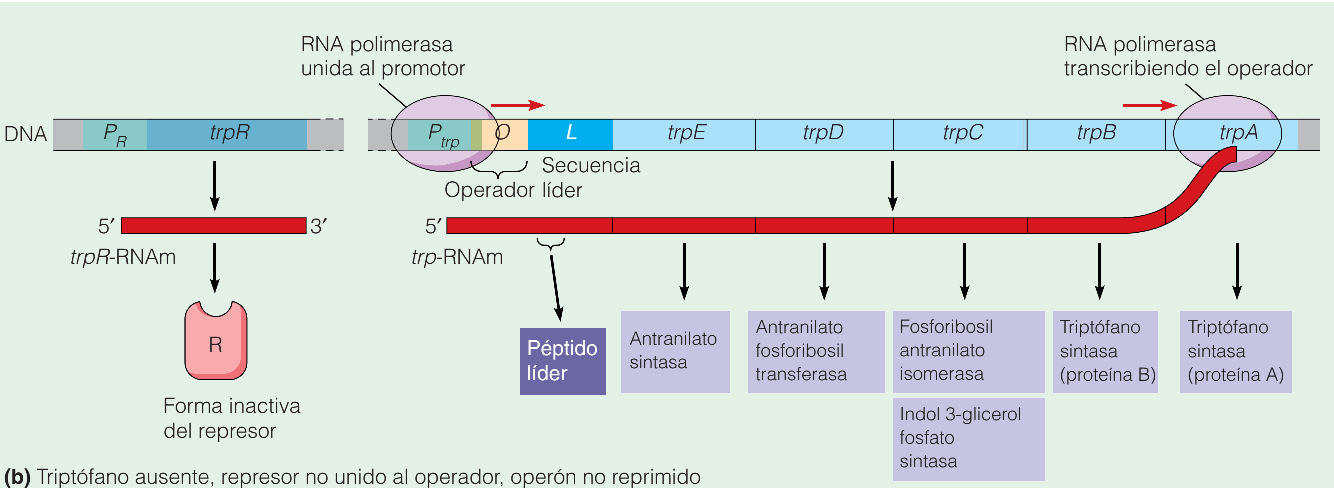
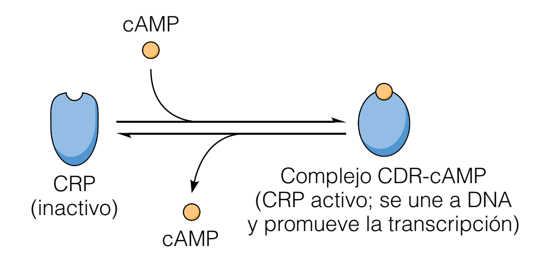


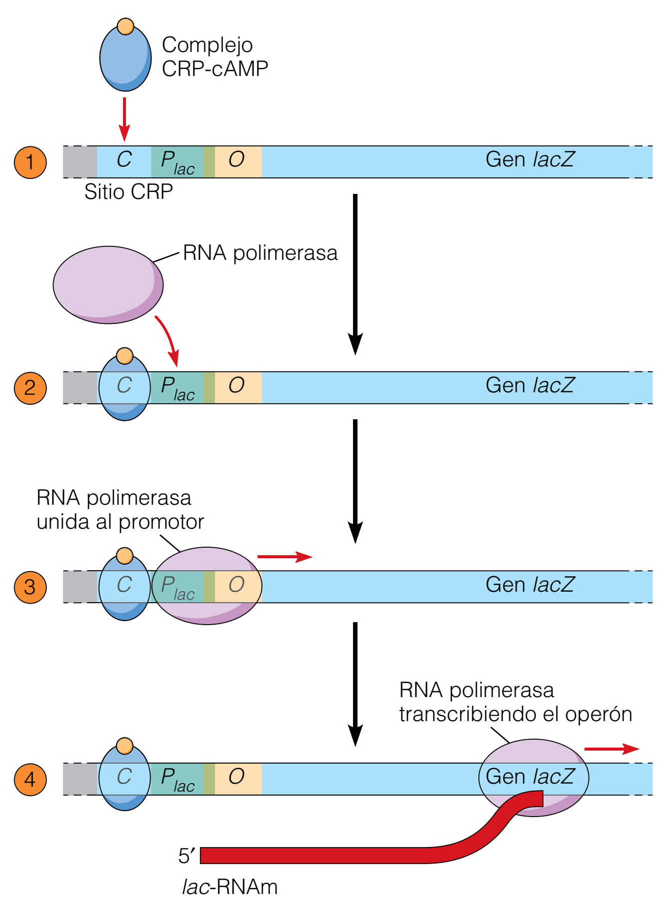
Figura 23.6 El operón triptófano (*trp*) de *E. coli*. (**a**) El operón *trp* consta de un segmento de DNA que incluye cinco genes contiguos (*trpE, trpD, trpC, trpB* y *trpA*) así como el de promotor (P_{trp}), operador (*O*) y la secuencias líder (*L*). Los genes son transcritos y regulados como una unidad. El mensaje policistrónico resultante codifica las enzimas de la ruta biosintética del triptófano. La proteína represora, codificada por el gen *trpR*, es inactiva (no puede reconocer al operador) en su forma libre. Cuando se encuentra unido al triptófano, el represor se convierte en su forma activa y se une fuertemente al operador, evitando así que la RNA polimerasa transcriba los genes del operón. (**b**) En ausencia de triptófano, el represor no se une al operador. La RNA polimerasa puede, por tanto, pasar el operador y transcribir los genes del operón *trp*, permitiendo a la célula sintetizar triptófano. La secuencia líder del mRNA tiene una función reguladora adicional, como veremos en las Figuras 23.8 y 23.9.

activa, que le permite unirse a una secuencia de bases concreta de los operones que producen enzimas catabólicas. Esta secuencia, el *sitio de reconocimiento de CRP*, está localizada por delante del promotor. La Figura 23.7b muestra la localización del sitio de reconocimiento (marcado como C) en el operón *lac*; sitios similares a éstos se encuentran también en otros operones inducibles. Cuando CRP, en su forma activa (es decir, el complejo CRP-cAMP) se une al sitio de reconocimiento en el DNA, la unión de la RNA polimerasa al promotor se ve muy favorecida, estimulando así la iniciación de la transcripción. Así, CRP tiene un efecto *positivo* en la expresión génica.

Este fenómeno explica cómo ejerce la glucosa su influencia sobre la transcripción de los genes que codifican enzimas catabólicas. Cuando la concentración de glucosa en el interior de la célula es alta, la concentración de cAMP cae y por lo tanto CRP se encuentra mayoritariamente en su forma inactiva. De esta forma CRP no puede estimular la transcripción de operones que producen enzimas catabólicas. Así, las células desactivan la síntesis de enzimas catabólicas que no son necesarias cuando la glucosa está disponible en abundancia como fuente energética. A la inversa, cuando caen los niveles de glucosa, los niveles de cAMP aumentan, uniéndose a CRP y activándola. El com-



(a) Activación alostérica de CRP



(b) Activación del complejo CRP-cAMP (CRP activo)

Figura 23.7 El receptor de cAMP (CRP) y su función. CRP produce represión catabólica mediante la activación de la transcripción de varios operones inducibles en presencia de AMP cíclico (cAMP), cuya concentración es a su vez controlada por glucosa. (**a**) CRP es una proteína alostérica que es inactiva en su forma libre pero se convierte en la forma activa por unión a cAMP. (**b**) El complejo CRP-cAMP resultante se une al promotor o cerca de éste en distintos tipos de operones inducibles, incluyendo el operón *lac*, incrementando la afinidad del promotor por la RNA polimerasa y estimulando, por lo tanto, la transcripción. ① En el operón *lac*, el complejo CRP-cAMP se une al sitio de reconocimiento de CRP (C) cerca de la región promotora, ② facilitando así la unión de la RNA polimerasa al promotor. ③ La RNA polimerasa se une al promotor y ④ transcribe el operón.

plejo CRP-cAMP incrementa mucho la transcripción de operones inducibles, lo que conduce a la producción de enzimas catabólicas que permiten a las células obtener energía para degradar otros nutrientes distintos de la glucosa. Por ejemplo, la transcripción del operón lac puede incrementarse 50 veces de este modo, por supuesto gracias a que el represor de este operón ha sido inactivado por la presencia de su efector (es decir, la alolactosa).

Los operones inducibles suelen estar sometidos a doble control

Como acabamos de ver, los operones inducibles como el operón *lac* suelen estar sujetos a dos tipos de control, lo que hace que sean sensibles a dos categorías de señales. El control negativo basado en interacciones represor-operador permite la presencia de una fuente energética alternativa (como la lactosa) para activar un operón concreto. El sistema de control positivo, basado en la acción de CRP, hace que la transcripción del operón sea sensible a la concentración de glucosa en la célula, mediada por el nivel de cAMP. Por lo tanto, una célula de *E. coli* podría tener niveles muy bajos de β-galactosidasa bien porque está creciendo en ausencia de lactosa y su operón *lac* está totalmente reprimido, bien porque ha accedido a una gran fuente de glucosa. En el último caso, la glucosa suprimirá el nivel de cAMP y por lo tanto CRP se inactivará y será incapaz de estimular la transcripción del operón *lac*, incluso aunque el operón no esté reprimido por la presencia de lactosa.

Para recordar bien los controles transcripcionales positivo y negativo, volvamos al efecto primario de la proteína reguladora que se une al operón. Si, en la unión al DNA, la proteína reguladora evita o desactiva la transcripción, entonces forma parte de un mecanismo de control negativo. Si, por el contrario, su unión al DNA activa o incrementa la transcripción, entonces la proteína reguladora es parte de un mecanismo de control positivo.

Los factores sigma determinan qué conjunto de genes puede expresarse

Además de las proteínas reguladoras que activan o reprimen la transcripción de operones concretos, las células bacterianas también hacen uso de distintos factores sigma (σ) para determinar qué conjunto de genes puede transcribirse. Recordemos del Capítulo 21 que una iniciación de la transcripción adecuada en las bacterias requiere que el núcleo de la enzima RNA polimerasa se combine con un factor sigma, una proteína que reconoce secuencias promotoras. En *E. coli* el factor sigma más común es σ^{70}, que inicia la transcripción de genes cuyos productos son necesarios para el crecimiento y metabolismo generales. Sin embargo, los cambios en las condiciones ambientales de la célula, como un incremento de la temperatura, la radiacion UV o la acidez, pueden desencadenar el uso de factores sigma al-

ternativos, como σ^S y σ^{32}. Cuando uno de estos factores alternativos está unido al núcleo de la RNA polimerasa, el reconocimiento del promotor se ve alterado, iniciándose así la transcripción de genes que codifican proteínas que ayudan a la célula a adaptarse a las condiciones ambientales. Después, otro factor sigma, σ^{54}, permite a la RNA polimerasa transcribir preferencialmente genes implicados en la utilización del nitrógeno.

Se han observado diferencias significativas en el número y tipo de factores sigma encontrados en diferentes tipos de bacterias. Por ejemplo, *E. coli* tiene alrededor de una docena de factores sigma, mientras que las bacterias del suelo *B. subtilis* y *B. coelicolor* utilizan alrededor de 20 y 60 factores sigma distintos, respectivamente. *S.coelicolor* es una bacteria especialmente compleja que lleva a cabo distintos procesos metabólicos y existe en varias formas que le permiten sobrevivir bajo un amplio rango de condiciones. Los numerosos factores sigma producidos por este organismo controlan, presumiblemente, subconjuntos de genes en respuesta a distintas señales ambientales y condiciones celulares.

Además de los distintos factores sigma codificados en los genomas bacterianos, los genomas de algunos bacteriófagos también codifican factores sigma. Esta organización permite al bacteriófago infectar a una célula bacteriana y hacer uso de su maquinaria transcripcional para producir un factor sigma específico que se une a la RNA polimerasa bacteriana, haciendo que sólo reconozca promotores virales.

La atenuación permite que la transcripción esté regulada después de la iniciación

Todos los mecanimos reguladores que hemos visto hasta ahora controlan la iniciación de la transcripción. Los procariotas también emplean algunos mecanismos reguladores que operan tras la iniciación. Un ejemplo clásico vino del descubrimiento de Charles Yanofsky y sus colaboradores, cuando encontraron que el operón *trp* de *E. coli* tenía un nuevo tipo de sitio de regulación localizado entre el promotor/operador y el primer gen del operón, *trpE*. Este segmento de DNA, denominado secuencia líder (o *L*) se transcribe dando lugar a un segmento de mRNA de 162 nucleótidos, localizado en el extremo 5′del mRNA policistrónico del *trp* (*véase* Figura 23.6b).

El análisis de los tránscritos del operón *trp* en condiciones variables reveló que, como se esperaba, el mRNA policistrónico completo se transcribe cuando el triptófano escasea. Esto permite que las enzimas de la ruta biosintética del triptófano se sinteticen y por lo tanto la ruta produzca más triptófano. Por otra parte, y como es de esperar, cuando hay abundancia de triptófano, los genes que codifican las enzimas de la ruta del triptófano no se transcriben. Sin embargo, un resultado inesperado fue que, en esas condiciones, el DNA correspondiente a la mayor parte de la secuencia líder *se transcribe*. Basándose en estas observaciones, Yanofsky sugirió que la secuencia líder contiene una región de control que es sensible a los niveles de triptófano. Esta secuencia control determina de alguna manera, no el hecho de que la transcripción pueda empezar, sino que continúe hasta el final. El efecto de este elemento de control se denominó **atenuación** por su función en la atenuación o reducción de la síntesis de mRNA.

Para comprender cómo funciona el mecanismo de atenuación, debemos empezar fijándonos en el segmento de mRNA líder del operón *trp* (Figura 23.8). Este líder tiene dos características inusuales que le permiten desempeñar su papel regulador. La primera es que, a diferencia de las secuencias líder no transcritas que suelen encontrarse en el extremo 5′de las moléculas de mRNA (*véase* Figura 22.6), hay una parte de la secuencia líder de *trp* que se transcribe, dando lugar a un *péptido líder* de 14 aminoácidos. Dentro

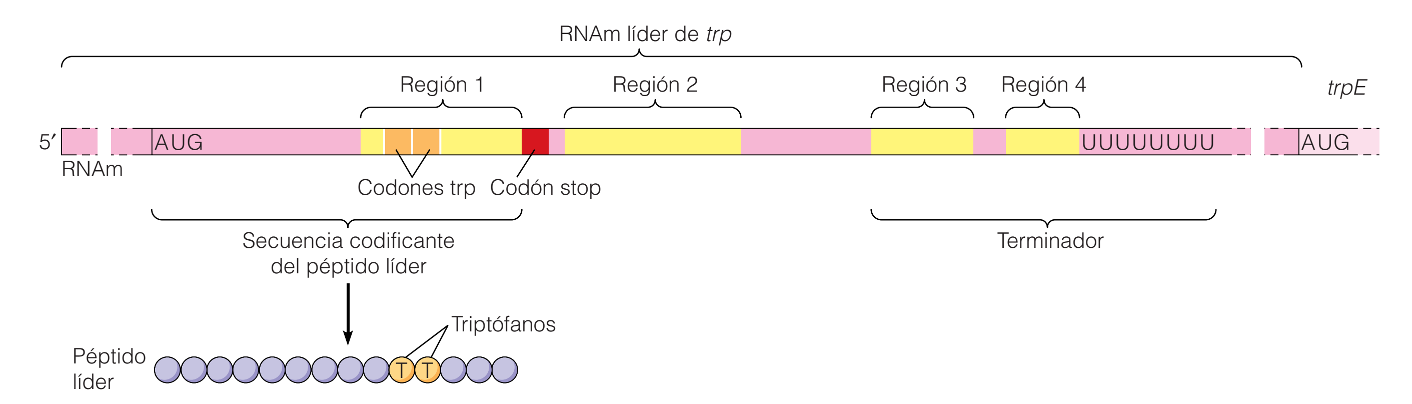
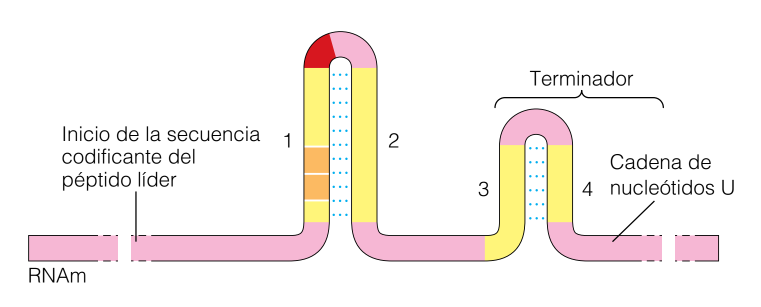


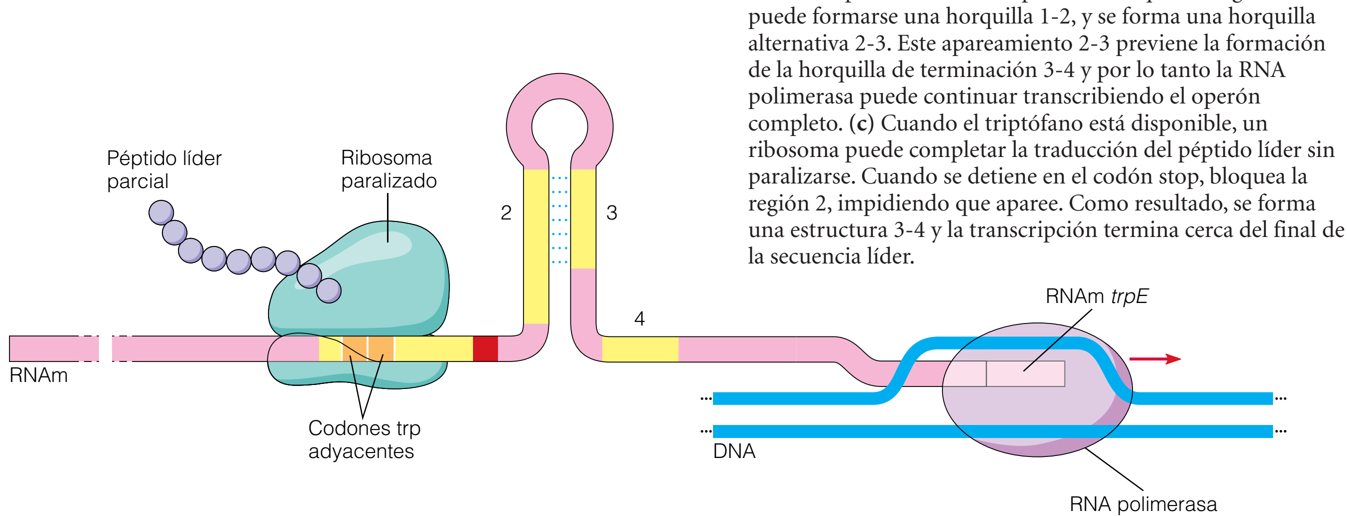
Figura 23.8 El mRNA líder de *trp*. El tránscrito del operón *trp* incluye 162 nucleótidos por delante del codón de iniciación de *trp E*, el primer gen del operón. Este mRNA líder incluye una sección que codifica un péptido líder de 14 aminoácidos. Dos de los codones triptófano (Trp) adyacentes dentro de la secuencia líder, tienen un importante papel en la regulación del operón por atenuación. El mRNA líder contiene cuatro regiones capaces de aparear en varias combinaciones para formar estructuras en forma de horquilla, como se muestra en la Figura 23.9. La parte del mRNA líder que contiene las regiones 3 y 4 y una cadena de ocho uridinas se denomina terminador.

de la secuencia del mRNA que codifica este péptido hay dos codones adyacentes que codifican triptófano; veremos que estos codones son importantes. La segunda es que el mRNA líder de *trp* también contiene cuatro segmentos (marcados como regiones 1, 2, 3 y 4) cuyos nucleótidos pueden aparear entre sí para formar varias estructuras en forma de horquilla o bucle. La región comprendida entre los segmentos 3 y 4, junto con una cadena adyacente de ocho nucleótidos U se denomina *terminador*. Cuando el apareamiento entre las regiones 3 y 4 genera un bucle, actúa como señal de terminación de la transcripción (Figura 23.9a). Recordemos que la señal típica de terminación en procariotas que se muestra en la Figura 21.12 es también un bucle en forma de horquilla seguido por una cadena de U's. La formación de esta estructura hace que la RNA polimerasa y la cadena de RNA en formación se separen del DNA.

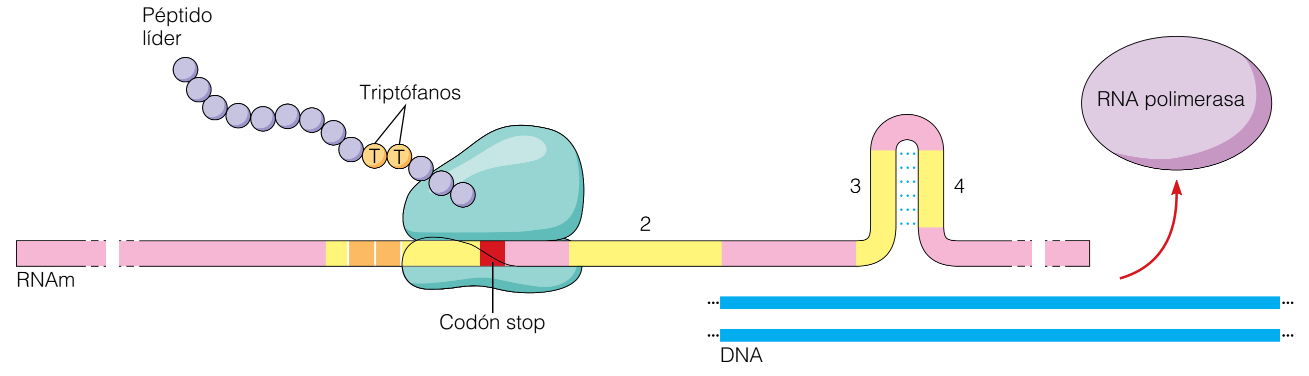
Como sugerían los experimentos de Yanofsky, la traducción del RNA líder tiene un papel crucial en el mecanismo de atenuación. Un ribosoma se une a su primer sitio de unión en el mRNA *trp* tan pronto como ese sitio aparece, y desde ahí continúa detrás de la RNA polimerasa.



(a) Las estructuras secundarias más estables del RNAm líder de *trp*



(b) Cuando hay escasez de triptófano, el ribosoma se paraliza, permitiendo que se forme una horquilla 2-3; la RA polimerasa continúa la transcripción



(c) Cuando hay abundancia de triptófano, el ribosoma continúa y la RNA polimerasa deja de transcribir

Figura 23.9 Atenuación en el operón *trp*. (**a**) La atenuación depende de la capacidad de las regiones 1 y 2, y 3 y 4 de la secuencia líder para complementarse, formando estructuras secundarias en horquilla. La estructura de horquilla 3-4 actúa como una señal de terminación de la transcripción; tan pronto como se forma, el RNA y la RNA polimerasa se liberan del DNA. (**b**) Durante los periodos de escasez de triptófano, un ribosoma que está traduciendo la secuencia codificante del péptido líder puede paralizarse cuando encuentra los dos codones triptófano (Trp) debido a la presencia de pocas moléculas de tRNA que llevan triptófano. Dado que el ribosoma paralizado en esta posición bloquea la región 1, no puede formarse una horquilla 1-2, y se forma una horquilla alternativa 2-3. Este apareamiento 2-3 previene la formación de la horquilla de terminación 3-4 y por lo tanto la RNA polimerasa puede continuar transcribiendo el operón completo. (**c**) Cuando el triptófano está disponible, un ribosoma puede completar la traducción del péptido líder sin paralizarse. Cuando se detiene en el codón stop, bloquea la región 2, impidiendo que aparee. Como resultado, se forma una estructura 3-4 y la transcripción termina cerca del final de la secuencia líder.

Cuando los niveles de triptófano son bajos (Figura 23.9b), la concentración de triptofanil tRNA (moléculas de tRNA que llevan triptófano) también es baja. Así, cuando el ribosoma llega a los codones triptófano del RNA líder, se paraliza brevemente, permitiendo la llegada del triptofanil tRNA. El ribosoma paralizado bloquea la región 1, permitiendo que se forme una estructura de horquilla alternativa por apareamiento entre las regiones 2 y 3. Cuando la región 3 está ocupada de esta forma, no puede aparear con la región 4 para crear una estructura de terminación, y por lo tanto la RNA polimerasa continúa, produciendo un tránscrito de mRNA completo del operón trp. Los ribosomas usan este mRNA para sintetizar las enzimas de la ruta del triptófano, y por lo tanto la producción de triptófano se incrementa.

Sin embargo, si hay exceso de triptófano y los niveles de triptofanil tRNA son elevados, el ribosoma no se paraliza en los codones triptófano (Figura 23.9c). En lugar de ello, el ribosoma continúa hasta el codón stop situado al final de la secuencia codificante del péptido líder y se para ahí, bloqueando la región 2. Esta pausa permite la formación del bucle 3-4, que es la señal de terminación de la transcripción. Por lo tanto, *la transcripción llevada a cabo por la RNA polimerasa termina* cerca del final de la secuencia líder (después de 141 nucleótidos) y el mRNA que codifica las enzimas implicadas en la síntesis de triptófano deja de producirse.

El mecanismo precedente, descubierto en *E. coli*, requiere que los ribosomas empiecen la traducción antes de que se haya completado la transcripción. Sin embargo, la atenuación no siempre requiere este acoplamiento entre la transcripción y la traducción. En la bacteria *B. subtilis*, el RNA líder transcrito del operón *trp* no es traducido por ribosomas y sigue funcionando como un atenuador. En este caso, la formación del bucle de terminación está controlada por una proteína de unión a triptófano. Cuando el triptófano está presente, el complejo triptófano-proteína se une al RNA líder y expone el bucle de terminación, terminando la transcripción y desactivando el operón *trp*.

Aunque la atenuación fue considerada un tipo inusual de regulación, parece ser relativamente común, especialmente en operones que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis de aminoácidos. Ahora se conocen varios mecanismos de atenuación y, en algunos operones, éste es el único modo de regulación. En otros, la atenuación complementa al operador en la regulación de la expresión génica, como en el operón *trp*.

Los ribointerruptores permiten que la transcripción y la traducción estén controladas por interacciones de pequeñas moléculas con RNA

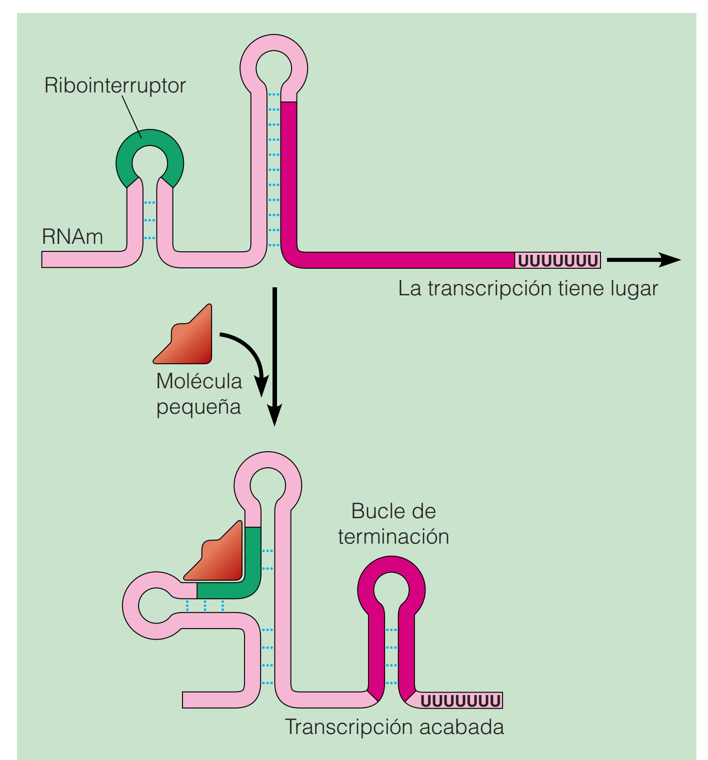
La capacidad de las moléculas pequeñas para inducir cambios conformacionales en las proteínas alostéricas tiene un papel fundamental en la regulación de la expresión génica. Ya hemos visto, por ejemplo, cómo está controlada la transcripción por la unión de alolactosa a la proteína represora *lac*, o el triptófano a la proteína represora *trp*, o el cAMP a la proteína receptora de cAMP. En cada caso, la producción de mRNA está alterada por la unión de una molécula pequeña a una proteína reguladora.

Las moléculas pequeñas también pueden regular la expresión génica por unión a sitios especiales del mRNA denominados **ribointerruptores**. La unión de estas pequeñas moléculas a su ribointerruptor correspondiente provoca cambios conformacionales en el mRNA, que afectan a la transcripción y a la traducción. Uno de los primeros ribointerruptores descubiertos en el RNA transcrito está en el operón de la *riboflavina (rib)* de *B. subtilis*. El operón *rib* consta de cinco genes implicados en la ruta de síntesis de las principales coenzimas, FMN y FAD. El RNA transcrito del operón *rib* tiene una secuencia líder que, como la secuencia *trp* líder que vimos anteriormente, contiene una región que se pliega en un bucle en forma de horquilla que terminará la transcripción. Como se muestra en la Figura 23.10 (a la izquierda), la unión de FMN a la secuencia líder promueve la formación de esta horquilla. Por tanto, la transcripción de rib termina cuando FMN está presente, paralizándose la producción de enzimas que no son necesarias porque están implicadas en la síntesis de FMN.

Además de regular la transcripción, la unión de pequeñas moléculas a ribointerruptores también puede controlar la traducción. Un ejemplo se encuentra en el mRNA que codifica enzimas implicadas en la ruta de síntesis de FMN y FAD de *E. coli*. A diferencia de lo que sucede en *B. subtilis*, los genes de *E. coli* que codifican estas enzimas no están agrupados en un solo operón aunque algunos de ellos están controlados por ribointerruptores. En este caso, la unión de FMN a su ribointerruptor en el mRNA promueve la formación de una horquilla que incluye las secuencias requeridas para la unión de mRNA a los ribosomas. Por lo tanto, secuestrando estas secuencias, la unión de FMN evita la interacción del mRNA con los ribosomas, y por lo tanto la iniciación de la traducción (*véase* Figura 23.10, derecha).

Regulación génica en eucariotas: control genómico

En los primeros tiempos de la biología molecular, una creencia popular era «lo que es cierto en *E. coli* también lo es en los elefantes». Esta máxima expresaba la convicción inicial de que casi todo lo aprendido sobre la función bacteriana en el nivel molecular podía aplicarse también a los eucariotas. No sorprende que poco después se viera que esto sólo era parcialmente cierto. En términos de rutas metabólicas centrales, de mecanismos de transporte de solutos a través de membrana y de características fundamentales, como la estructura del DNA, la síntesis de proteínas y la función enzimática, hay muchas semejanzas entre los



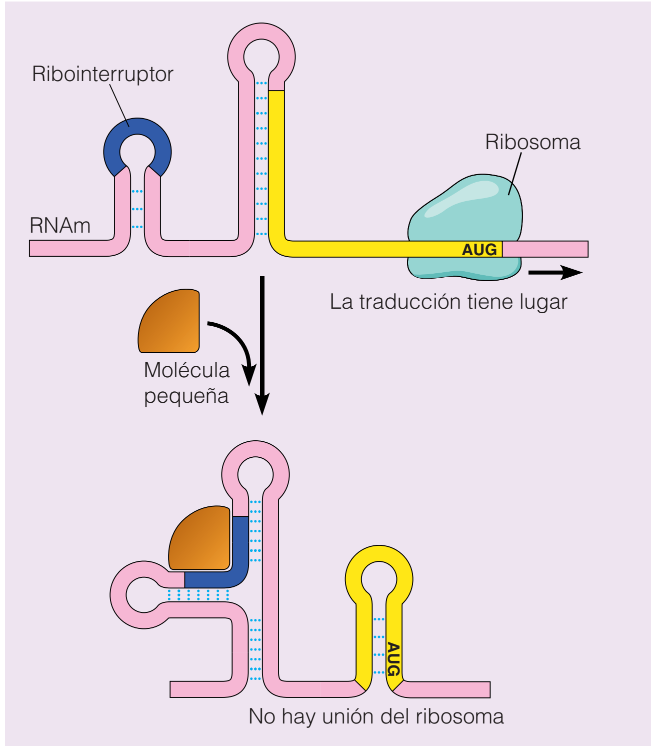


Figura 23.10 Control de la expresión génica mediada por ribointerruptor. Este modelo muestra dos ejemplos de cómo la unión de pequeñas moléculas a un ribointerruptor en el mRNA puede ejercer un control sobre la transcripción y la traducción. (*Izquierda*) La unión de una pequeña molécula a un ribointerruptor en la secuencia líder de algunos mRNAs desencadena la formación de una horquilla que termina la transcripción. La unión de FMN a la secuencia líder del mRNA transcrito del operón *rib* de *B. subtilis* funciona de esta manera. (*Derecha*) En otros mRNAs, la pequeña molécula que se une a un ribointerruptor desencadena la formación de una horquilla que contiene el sitio donde suelen unirse los ribosomas, interfiriendo, por lo tanto, en la iniciación de la transcripción. En *E. coli*, FMN inhibe la traducción del mRNA que codifica las enzimas implicadas en la síntesis de FMN.

mundos procariota y eucariota. En este sentido, muchos de los descubrimientos hechos en procariotas han podido extrapolarse a eucariotas.

Pero cuando se trata de la regulación de la expresión génica, hay que considerar las comparaciones con cautela. El DNA de las células eucariotas se empaqueta en fibras de cromatina y se localiza en un núcleo separado, por la envuelta nuclear, de la maquinaria de síntesis de proteínas. Los genomas eucariotas pueden ser mucho más grandes que los de procariotas, y los eucariotas multicelulares deben generar distintos tipos celulares a partir del mismo genoma. Estas diferencias requieren una gran diversidad de mecanismos de control génico, que en algunos casos difieren significativamente de los que se suelen presentar en procariotas.

Los eucariotas multicelulares están compuestos de numerosas células especializadas

Para situar nuestra exposición sobre el control de los genes eucariotas, vamos a considerar brevemente la gran cantidad de desafíos reguladores a los que se tienen que enfrentar los eucariotas pluricelulares, que suelen estar compuestos por cientos de tipos celulares distintos. En estos casos, un organismo sencillo consta de una mezcla compleja de tipos celulares especializados o *diferenciados* —por ejemplo, nervio, músculo, hueso, sangre, cartílago y grasa— agrupados en varias combinaciones para formar tejidos y órganos. Las células diferenciadas se distinguen entre sí en base a sus diferencias a nivel microscópico y a los productos que fabrican. Por ejemplo, loseritrocitos sintetizan hemoglobina, los nervios producen neurotransmisores y los linfocitos anticuerpos. Estas diferencias indican que el control selectivo de la expresión de muchos genes distintos debe tener un papel fundamental en el mecanismo responsable de que las células se diferencien.

Las células diferenciadas se producen a partir de poblaciones inmaduras de células no especializadas denominadas **células madre**, por el proceso de **diferenciación celular**. Las células madre se caracterizan por su capacidad de división ilimitada y su capacidad, en presencia de las señales adecuadas, de diferenciarse en distintas células espe-

cializadas, normalmente acompañadas de un cese en la división celular. El clásico ejemplo se encuentra en los embriones, cuyas *células madre embrionarias* se diferencian en todos los tipos celulares que forman un organismo. También se encuentran células madre en tejidos adultos, donde reponen las células diferenciadas que deben ser sustituidas. Por ejemplo, las células madre de la médula ósea se diferencian hacia todos los tipos celulares presentes en la sangre. Algunos estudios sugieren que las células madre de los adultos podrían ser capaces de diferenciarse también a otros tipos celulares, pero esto está todavía en estudio.

La posibilidad de aislar y crecer células madre en cultivo en los laboratorios abre las puertas a que los científicos puedan llegar a producir nuevas células sanas para sustituir los tejidos dañados de pacientes con distintas enfermedades. Por ejemplo, las células madre que se pueden diferenciar en células nerviosas podrían usarse para reparar el daño cerebral que se da en pacientes que sufren traumatismos, Parkinson o Alzheimer. O podrían usarse para sustituir células pancreáticas dañadas en pacientes con diabetes o células del músculo esquelético defectuosas, que se encuentran en individuos con distrofia muscular.

La expresión génica en eucariotas está regulada en cinco niveles fundamentales

El hecho de que una planta o animal pluricelular pueda necesitar producir cientos de tipos celulares distintos usando un genoma, pone de manifiesto la dificultad de explicar la regulación génica en eucariotas únicamente en términos de mecanismos procariotas —¡los elefantes no son en absoluto *E. coli* grandes!—. Si vamos a profundizar en el estudio de la regulación génica en eucariotas, debemos hacer una aproximación desde la perspectiva eucariota.

El patrón de genes que se expresan en cualquier célula eucariota es, en último término, un reflejo del espectro de productos génicos funcionales —normalmente proteínas, pero en algunos casos RNAs— producidos por esa célula. El patrón general es la culminación de los controles ejercidos a diferentes niveles. Estos puntos de control potenciales se representan en la Figura 23.11, que muestra el flujo de información genética desde el DNA genómico del núcleo hasta las proteínas funcionales del citoplasma (muchos de estos puntos de control, aunque no todos, son también aplicables a procariotas). Como se puede ver, hay cinco niveles en los que puede ejercerse el control: ① el genoma, ② la transcripción, ③ el procesamiento del RNA y la exportación del núcleo al citoplasma, ④ la traducción

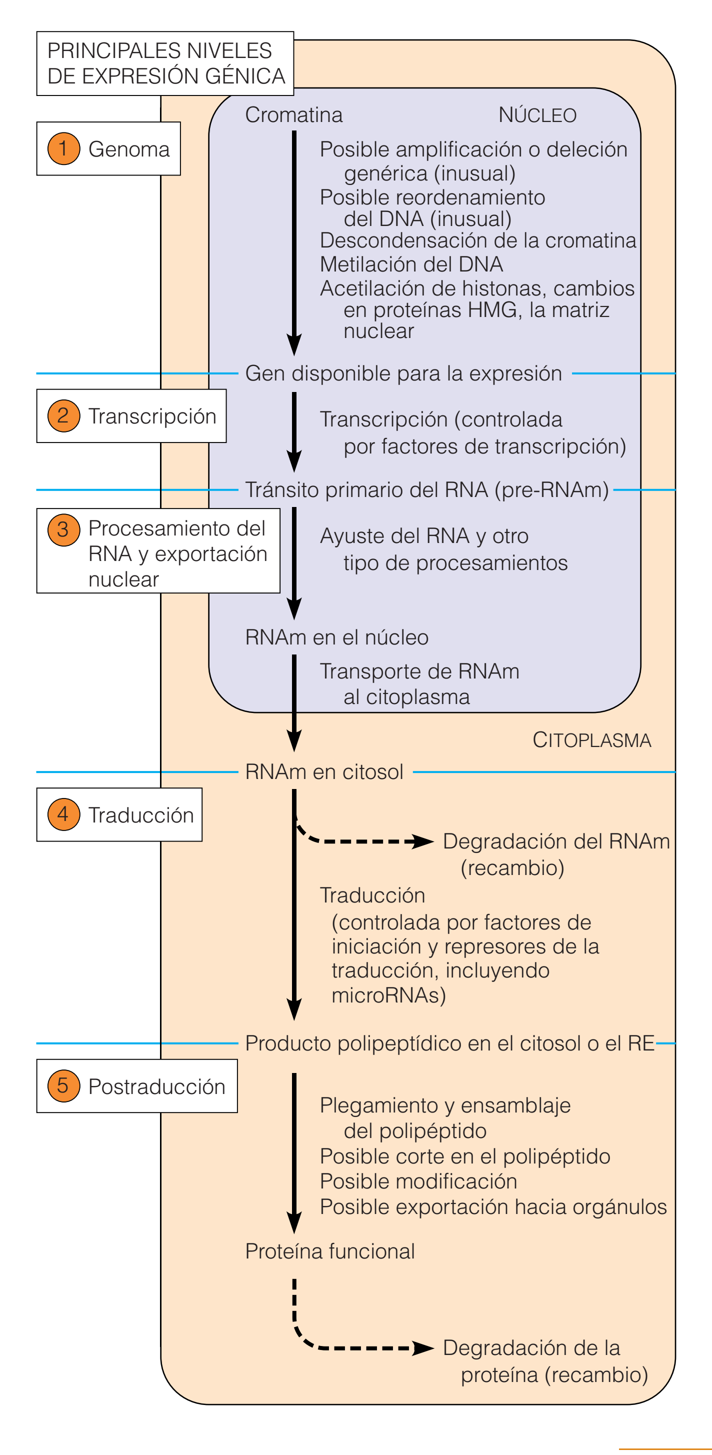


Figura 23.11 Los múltiples niveles de expresión génica y regulación en eucariotas. La expresión génica puede ser regulada ejerciendo control sobre alguno de los procesos que ocurren en cualquiera de los siguientes niveles. ① En el genoma, incluyendo la poco común amplificación o reordenamiento de segmentos de DNA, la descondensación de la cromatina (o condensación) y la metilación del DNA. ② Transcripción, donde algunos mecanismos de control críticos determinan qué genes son activos en un determinado momento. ③ Procesamiento del RNA en el núcleo y su exportación. ④ Traducción, la síntesis de polipéptidos. Este nivel incluye el direccionamiento de algunos polipéptidos sintetizados *de novo* al RE. ⑤ Los procesos postranscripcionales, entre los que se encuentran el plegamiento y ensamblaje de polipéptidos, el procesamiento proteolítico, las modificaciones de polipéptidos por adición de grupos químicos y la exportación de proteínas hacia orgánulos (y la secreción hacia el exterior de la célula). La degradación de proteínas completas también está sujeta a regulación.

y ⑤ los eventos prostraducción. Los mecanismos reguladores de las tres últimas categorías son todos ejemplos de *control postranscripcional,* un término que hace referencia a una amplia variedad de procesos. En lo que queda de capítulo, examinaremos los mecanismos utilizados por los eucariotas para ejercer control sobre la expresión génica en cada uno de los cinco niveles.

Por regla general, todas las células de un organismo pluricelular contienen el mismo conjunto de genes

El primer nivel de control se ejerce en el genoma. En plantas y animales pluricelulares, cada tipo de célula especializada expresa sólo una pequeña fracción del número total de genes contenidos en el genoma, ya que casi todas las células de cada organismo (excepto los espermatozoides y los óvulos, que son células haploides) contienen exactamente el mismo conjunto de genes. En los animales, la primera evidencia de que incluso las células altamente especializadas contienen un conjunto completo de genes vino de la mano de John Gurdon y son colaboradores. En los estudios con *Xenopus laevis*, la rana africana de uñas, transplantaron el núcleo de células diferenciadas de renacuajo en huevos no fertilizados a los que les habían eliminado el núcleo. Aunque la frecuencia de éxitos fue baja, algunos huevos que contenían núcleos transplantados dieron lugar a renacuajos viables, capaces de nadar. Un nuevo organismo generado mediante este proceso de transplante nuclear es un clon de otro organismo del que procede el núcleo, ya que las células del nuevo organismo contienen DNA derivado de células del organismo original. El resultado de estos estudios indicó que el núcleo de las células diferenciadas puede dirigir directamente el desarrollo de un nuevo organismo. Se dice, por lo tanto, que ese núcleo es totipotente: contiene un conjunto completo de genes necesarios para crear un nuevo organismo del mismo tipo del que el fue tomado el núcleo.

Un ejemplo especialmente espectacular de un animal clonado apareció en 1997, cuando Ian Wilmut y sus colaboradores escoceses acapararon los titulares de los periódicos por el nacimiento de una oveja clonada, Dolly —el primer animal clonado de una célula derivada de un adulto—. Dolly nació de un óvulo de oveja cuyo núcleo original había sido sustituido por el de la célula de una oveja adulto. Posteriormente se han usado técnicas similares para clonar animales de otras especies, entre las que se incluyen la vaca, el ratón, la cabra, el cerdo, el conejo y el gato. Como veremos en el Anexo 23A, la clonación es una gran hazaña que plantea muchas cuestiones sobre las futuras aplicaciones de esta tecnología.

La capacidad para producir nuevos organismos completos utilizando la información genética derivada de células diferenciadas también se ha demostrado en plantas. En un experimento pionero dirigido por Frederick Steward, se crearon nuevas plantas por división mitótica de células diferenciadas que procedían de plantas maduras. Por ejemplo, se puede coger un trozo de zanahoria, cortarlo en pequeños fragmentos y aislar células que posteriormente se colocan en un medio de cultivo y crecen en un tubo de ensayo. Las células aisladas en estas condiciones crecen posteriormente dando lugar a plantas de zanahoria completas con raíces, yemas y hojas normales. Así, el núcleo de las células diferenciadas no requiere el transplante a un huevo para expresar totipotencia. La expresión de la totipotencia se desencadena simplemente liberando a las células del contacto con sus células vecinas. Este método para generar clones en plantas tiene gran interés comercial porque proporciona una forma fiable de producir en cultivo cepas de plantas con características genéticas de interés, sin la variabilidad inherente a la reproducción sexual.

La amplificación y deleción génicas pueden alterar el genoma

Aunque las evidencias anteriores indican que el genoma tiende a ser el mismo en todas las células de un organismo eucariota adulto, algunos tipos de regulación génica suponen excepciones a esta regla. Un ejemplo es la **amplificación génica**, es decir, la replicación selectiva de ciertos genes. La amplificación génica puede considerarse un ejemplo de **control genómico**, es decir, un cambio de regulación en la organización estructural del genoma.

Uno de los ejemplos de amplificación génica mejor estudiados es el de los genes del RNA ribosómico de *Xenopus laevis*, el organismo utilizado por Gurdon en sus experimentos de transplante nuclear. El genoma haploide de *Xenopus* normalmente contiene unas 500 copias de los genes que codifican los RNAr 5,8S, 18S y 28S. Durante la oogénesis (el desarrollo del huevo antes de la fertilización), el DNA de este conjunto de genes completo se replica selectivamente unas 4.000 veces, de manera que el oocito maduro contiene cerca de 2 millones de copias de los genes de RNAr. Aparentemente es necesario este nivel para conseguir el sufiente nivel de biosíntesis de ribosomas que debe tener lugar durante la oogénesis, ya que los ribosomas son necesarios para hacer frente a la alta tasa de síntesis de proteínas necesaria para el desarrollo embrionario.

Las copias de RNAr extra, generadas por amplificación génica, están presentes en círculos extracromosómicos de DNA distribuidos entre cientos de núcleolos que aparecen en el núcleo del oocito a medida que progresa la amplificación (Figura 23.12). Este ejemplo de amplificación génica implica genes cuyos productos son *RNA* en lugar de proteínas. La expresión de genes que codifican proteínas —incluso proteínas necesarias en grandes cantidades, como las proteínas ribosómicas— puede ser incrementada lo suficiente aumentando la traducción de mRNA, porque cada molécula de éste puede ser traducida muchas veces.

Además de amplificar secuencias de genes cuyo producto es muy demandado, algunas células también dele-

Dolly: una oveja sin padre

En enero de 1997, ¿quién hubiese esperado que el avance científico más importante del año estuviese descansando tranquilamente en un granero? El mes siguiente, Ian Wilmut acaparó los titulares de los periódicos de todo el mundo presentándonos a Dolly, el primer animal clonado a partir de una célula adulta. Dolly se creó extrayendo el núcleo de la célula de una oveja adulta y transfiriéndolo al del óvulo de una oveja distinta, al que se había eliminado su propio núcleo.

Aunque esta técnica de transferencia nuclear ya se había usado antes para clonar animales, nunca se había conseguido con éxito tomando células de un adulto. Los primeros estudios en ranas revelaron que los núcleos extraídos de células embrionarias o de renacuajos podían programar el desarrollo de una rana adulta normal cuando se transferían al huevo de una rana. Sin embargo, cuando se utilizaba como donador el núcleo de células adultas, el desarrollo nunca progresaba más allá del estadio de renacuajo.

Wilmut sospechó que estos fallos previos estaban causados por el estado activo de la cromatina en las células donadoras. El truco, dijo, es hacer que el DNA de las células donadoras se comporte más como la cromatina inactiva de la típica célula espermática que fecundaría normalmente el huevo. Este equipo de investigación llevó a cabo esta idea tomando células de la glándula mamaria de la ubre de una oveja hembra de 6 años y privándolas de nutrientes en cultivo, para forzar su entrada en la fase G0 del ciclo celular. Esto hizo que muchos genes se inactivaran y aseguraba que las células eran diploides (a diferencia de las células en S o G2, que han replicado parte o todo su DNA). Cuando el núcleo de estas células se transfirió a un óvulo sin núcleo, el DNA diploide se reprogramaría por la influencia del citoplasma del huevo, para permitir el desarrollo embrionario normal. La implantación de este huevo en el útero de otra oveja hembra condujo al nacimiento de una oveja sin padre, es decir, una oveja cuyas células tienen el mismo DNA nuclear que las células de la oveja de 6 años de las que procede el núcleo donador (Figura 23A.1).

Pocos años después de estos novedosos experimentos, se han utilizado técnicas similares para clonar otros animales, incluyendo vacas, cabras y cerdos. Pero, ¿tiene esta tecnología algún valor práctico? Una posibilidad es insertar genes potencialmente útiles en las células donadoras antes de transferir sus núcleos a huevos para clonarlas. Por ejemplo, los investigadores están usando técnicas de DNA recombinante para introducir genes de proteínas importantes en medicina, como los factores de coagulación sanguíneos humanos, que son difíciles de producir por otros medios. Esta aproximación ya se ha usado para clonar ovejas que producen leche que contiene el factor de coagulación sanguíneo del que carecen los hemofílicos. Así, es posible imaginar, en un futuro no muy lejano, una nueva forma de ganadería en la que la clonación se utilice para crear rebaños de animales idénticos que se utilicen no por su leche o carne, sino como fuentes de proteínas humanas importantes en medicina y tal vez incluso de tejidos y órganos.

Una implicación incluso más impactante de esta tecnología de la clonación es la de los recientes intentos de clonar animales que están en peligro de extinción o que se han extinguido recientemente. Pero la posibilidad más controvertida se refiere a la cuestión de si es o no ético clonar células humanas. Por el momento, parece ser que producir clones humanos sanos sería muy difícil. Llevó 277 intentos producir a Dolly y muchos animales clonados que parecían normales al nacer, desarrollaron problemas de salud más tarde y murieron prematuramente. La propia Dolly desarrolló artritis y problemas respiratorios, de manera que tuvo que ser sacrificada a los 6 años, bastante antes de lo normal. En vista de estos problemas y del casi universal rechazo al proyecto de la clonación en el hombre, muchos individuos están reclamando leyes contra el uso de esta tecnología para duplicar seres humanos. Algunos expertos en bioética ya han sugerido que la sociedad podría finalmente encontrar aceptable la clonación bajo ciertas circunstancias, como la clonación de niños que van a morir o para ayudar a una pareja estéril a tener hijos. Aunque este tipo de discusiones puede hacer que la gente se sienta incómoda, el rápido desarrollo de la ciencia en este campo hace imprescindible que la sociedad se implique en el debate.

Otra aplicación potencial de la técnica de transferencia nuclear es la producción de células madre que podrían utilizarse para sustituir células dañadas en enfermedades como la diabetes, la distrofia muscular, el Parkinson o el Alzheimer. Los científicos ya han probado que es posible generar células madre embrionarias que están directamente dirigidas a un individuo tomando el núcleo de una célula adulta de ese individuo y transplantándolo en un óvulo cuyo núcleo ha sido previamente eliminado. Después de dividirse varias veces en cultivo, la masa resultante de cientos de células contiene células madre que se reproducen indefinidamente y retienen la capacidad de formar todos los tipos celulares del organismo. Sin embargo, el desarrollo de esta tecnología está todavía en sus primeros estadios y deben resolverse muchos temas técnicos y éticos antes de que podamos averiguar si las células madre pueden usarse para el tratamiento de enfermedades humanas.



Figura 23A.1 Dolly, el primer animal clonado a partir de una célula adulta.

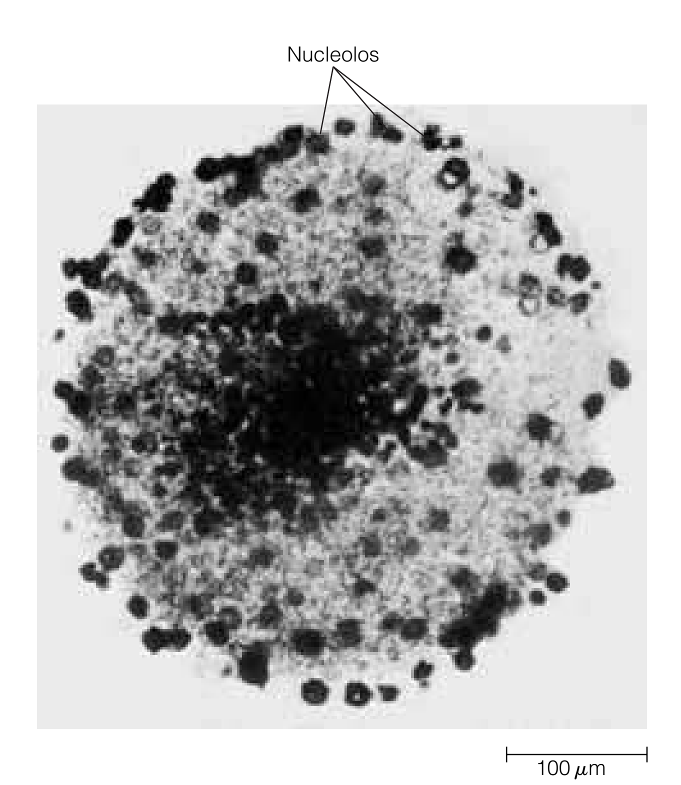


Figura 23.12 Amplificación de genes rRNA en un oocito de anfibio. Esta imagen de microscopio óptico muestra un núcleo aislado de un oocito de *Xenopus,* teñido para revelar la cantidad de nucleolos que se forman durante la oogénesis, por la amplificación de genes de RNA ribosómico. Cada nucleolo contiene múltiples copias de genes rRNA, presentes como círculos extracromosómicos.

cionan genes cuyos productos no son requeridos. Un ejemplo extremo de **deleción génica** (también denominada *disminución de DNA*) se encuentra en los eritrocitos de mamíferos, que eliminan completamente su núcleo después de que se han sintetizado las cantidades adecuadas de mRNA para sintetizar hemoglobina. Un ejemplo menos extremo se encuentra en un grupo de pequeños crustáceos denominados copépodos. Durante el desarrollo embrionario de los copépodos, las regiones heterocromáticas (transcripcionalmente inactivas) de sus cromosomas se escinden y eliminan de las células, excepto aquellas regiones destinadas a convertirse en gametos. De esta forma, más de la mitad del contenido total de DNA del organismo se elimina de los cuerpos celulares.

Los reordenamientos de DNA pueden alterar el genoma

Se conocen algunos casos en los que la regulación génica está basada en el movimiento de segmentos de DNA de un sitio a otro dentro del genoma, un proceso conocido como reordenamiento del DNA. Dos ejemplos particularmente interesantes son el mecanismo usado por las células de levadura para controlar el apareamiento y el mecanismo usado por los vertebrados para producir millones de anticuerpos distintos.

Reordenamiento de los alelos de apareamiento. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, el apareamiento se da cuando las células haploides de dos tipos de apareamiento distintos, denominados α y *a*, se fusionan dando lugar a una célula diploide. Todas las células haploides llevan los dos tipos de alelos de apareamiento; sin embargo, el fenotipo de apareamiento real depende de cuál de los dos alelos, α o *a*, esté presente en un sitio especial del genoma, denominado **locus *MAT***. Las células cambian normalmente de tipo de apareamiento, seguramente como forma de optimizar las posibilidades de apareamiento. Lo hacen moviendo los alelos alternativamente al locus *MAT*. Este proceso de reordenamiento del DNA se denomina **mecanismo cassette**, porque el locus que define el tipo de apareamiento es como un reproductor en el que se puede insertar el «cassette» α o *a* y «reproducirse» (transcribirse).

La Figura 23.13 describe el mecanismo cassette con más detalle. El locus *MAT*, con el alelo α o *a*, está localizado en el cromosoma 3 de la levadura, aproximadamente entre las copias de los dos alelos. El locus donde se encuentra la copia extra del alelo α se denomina *HMLα;* el locus con una copia extra del alelo *a* se denomina *HMRa.* En el cambio de tipo de apareamiento, una célula de levadura sintetiza una copia del otro alelo de tipo de apareamiento, *HMRa* o *HMLα*, e inserta este nuevo «cassette» en el locus *MAT*. Sin embargo, antes de que el nuevo cassette pueda insertarse, el viejo cassette debe eliminarse (mediante una

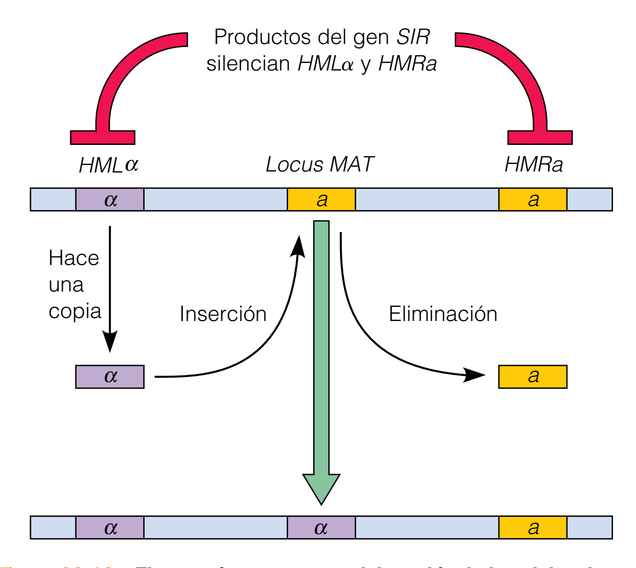


Figura 23.13 El mecanismo cassette del cambio de los alelos de apareamiento. El cromosoma 3 de *Saccharomyces cerevisiae* contiene tres copias de información. Los loci *HMLα* y *HMRa* contienen copias completas de las formas α y *a* del gen, respectivamente, pero la transcripción de estos loci está inhibida por los productos del gen *SIR*. El tipo de apareamiento real de la célula está determinado por el alelo presente en el locus MAT. Cuando una célula cambia los tipos de apareamiento, el DNA α o *a* del locus MAT es eliminado y sustituido por una copia de DNA del tipo de apareamiento alternativo. Como ejemplo, esta figura ilustra el cambio del tipo de apareamiento *a* al α.

endonucleasa específica) y ser descartado. A diferencia de la secuencia de DNA del locus *MAT*, las secuencias de DNA de *HMLα* y *HMRa* nunca cambian (excepto por mutaciones raras).

El DNA del alelo de cada tipo de apareamiento codifica, de hecho, varias proteínas distintas, incluyendo proteínas secretoras y receptores de superficie. Son estas proteínas, codificadas por el alelo insertado en el locus MAT, las que dan a cada célula el fenotipo *α* o *a*. Pero la presencia de copias extra de los alelos en *HMLα* y *HMRa* plantea una cuestión importante: si la célula tiene copias completas de los dos alelos, *α* y *a*, en estas localizaciones, ¿por qué no se sintetizan los dos conjuntos de proteínas? La respuesta es que un conjunto de genes reguladores, conocidos como *genes reguladores de silenciamiento de información (SIR)*, actúan reprimiendo la expresión de la información genética en *HMLα HMRa* por unión a secuencias específicas que rodean a los cassettes *α* y *a* en *HMLα* y *HMRa*.

Reordenamiento en los genes de los anticuerpos. Los linfocitos del sistema inmune de vertebrados utilizan un tipo de reordenamiento algo distinto en el DNA para producir anticuerpos. Los anticuerpos son proteínas compuestas por dos tipos de subunidades, denominadas *cadenas ligeras* y *cadenas pesadas*. Los vertebrados fabrican millones de tipos distintos de anticuerpos, cada uno producido por un linfocito distinto (y su descendencia) y cada uno capaz de reconocer y unirse específicamente a una molécula extraña distinta. Pero esta enorme diversidad de anticuerpos crea un potencial problema: si cada molécula de anticuerpo estuviera codificada por un gen distinto, el DNA de una persona estaría ocupado por los millones de genes de los anticuerpos que se requerirían.

Los linfocitos evitan este problema empezando con un número relativamente pequeño de segmentos de DNA distintos y los reordenan en varias combinaciones para producir millones de genes de anticuerpos únicos, cada uno formado en un linfocito distinto. El proceso de reordenamiento implica cuatro tipos de secuencias de DNA, denominadas *segmentos V, J, D* y *C*. El segmento C codifica la *región constante* de una cadena ligera o pesada, cuya secuencia de aminoácidos es la misma entre los distintos anticuerpos; los segmentos V, J y D codifican *regiones variables* que difieren entre los distintos anticuerpos y permiten a cada uno de ellos reconocer y unirse a un tipo específico de molécula extraña.

Para ver cómo funciona, vamos a considerar las cadenas pesadas de los anticuerpos humanos, que están constituidas por cerca de 200 tipos de segmentos V, más de 20 tipos de segmentos D y al menos 6 tipos de segmentos J. Como se muestra en la Figura 23.14, las regiones de DNA que contienen los distintos segmentos V, D y J se reordenan durante el desarrollo del linfocito para unir al azar un segmento V, un segmento D y uno J en cada célula. Este reordenamiento al azar permite al sistema inmune crear al menos $200 \times 20 \times 6 = 24.000$ tipos distintos de regiones varibles de cadenas pesadas. De forma similar, pueden generarse miles de tipos de regiones variables de cadenas ligeras (las cadenas ligeras están construidas por sus propios tipos de segmentos V, J y C; no tienen segmentos D). Finalmente, cada uno de los miles de tipos distintos de cadenas pesadas pueden ser ensamblados con cualquiera de los miles de tipos de cadenas ligeras distintas, generando la posibilidad de crear millones de tipos de anticuerpos distintos. El resultado neto es que se producen millones de anticuerpos distintos en el genoma humano por reordenamientos de unos pocos cientos de tipos distintos de segmentos V, D, J y C.

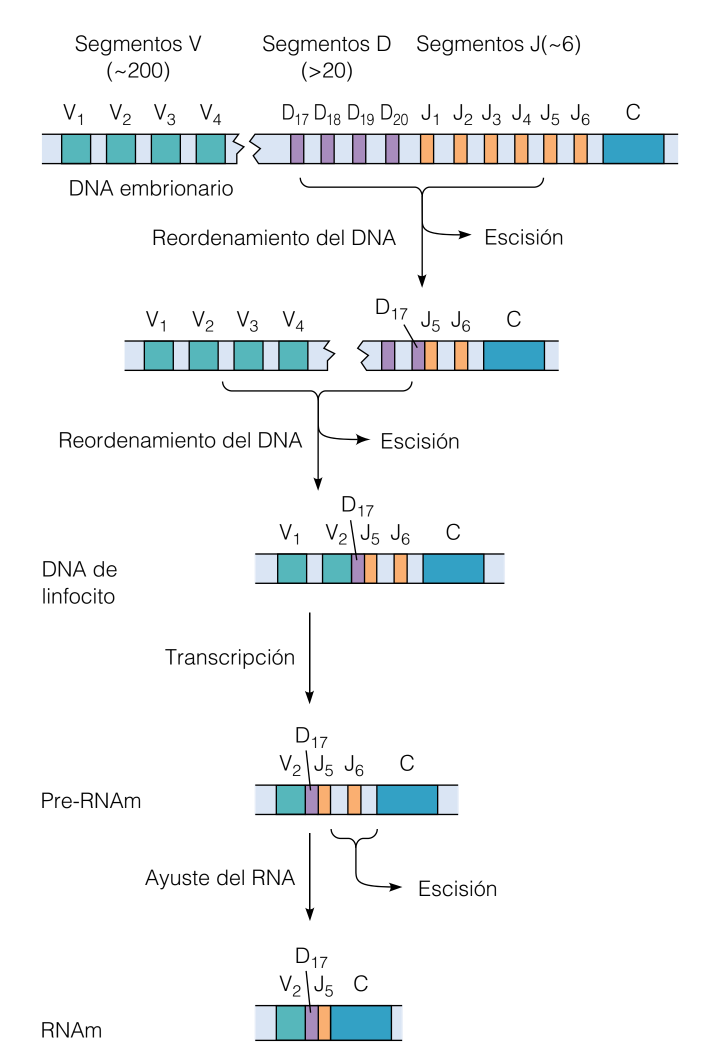


Figura 23.14 El reordenamiento del DNA durante la formación de las cadenas pesadas de los anticuerpos. Los genes que codifican las cadenas pesadas de los anticuerpos están formados por reordenamientos en el DNA que implican múltiples tipos de segmentos V, D y J. En este ejemplo, una escisión inicial del DNA elimina al azar varios segmentos D y J, llevando D_{17} junto a J_5. En una segunda escisión al azar se eliminan varios segmentos V y D, llevando V_2 junto a D_{17}. Tras la transcripción, las secuencias que separan el segmento $V_2D_{17}J_5$ del segmento C se eliminan por ayuste del RNA.

El proceso de reordenamiento del DNA que genera los genes de los anticuerpos también activa la transcripción de estos genes por medio de un mecanismo que implica a secuencias especiales de DNA denominadas *potenciadores o enhancers* que, como veremos brevemente, incrementan la tasa de iniciación de la transcripción. Hay potenciadores que están localizados cerca de secuencias de DNA que codifican segmentos C, pero no hay una secuencia promotora en esta área y por tanto, la transcripción no se da normalmente. El promotor para la transcripción del gen está localizado por delante del DNA que codifica los segmentos V, pero no es lo suficientemente eficaz como para promover la transcripción en ausencia de la secuencia potenciadora. Así, antes del reordenamiento del DNA, el promotor y las secuencias potenciadoras del gen de un anticuerpo están tan lejos que no se da la transcripción; sólo tras el reordenamiento se aproximan lo suficiente como para que se active la transcripción.

Los cromosomas politénicos proporcionan la evidencia visual de que la descondensación de la cromatina está implicada en el control genómico

Otra posibilidad de control del genoma eucariótico —es decir, el DNA cromosómico— es la que se deriva de la accesibilidad a la maquinaria transcripcional de la célula. Recordemos del Capítulo 21, que para iniciar la transcripción, una RNA polimerasa eucariota debe interaccionar tanto con el DNA como con proteínas específicas (factores generales de transcripción) en la región promotora de un gen. Excepto cuando el gen está siendo transcrito, su región promotora está embebida en la cromatina, una superestructura de fuertemente plegada y ordenada. La descondensación de la cromatina (desplegamiento) parece ser necesaria para la expresión de los genes eucariotas.

Las primeras evidencias de que la descondensación de la cromatina es necesaria para la transcripción de los genes resultaron de la visualización al microscopio de cierto tipo de cromosomas de insectos, que estaban siendo transcritos. Dado que el DNA de la mayoría de las células eucariotas está disperso por el núcleo como una masa de fibras de cromatina enrollada, normalmente es difícil observar la transcripción de genes individuales al microscopio. Pero, gracias a la utilización de un tipo inusual de células de insecto, se ha podido hacer frente a este problema. En la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y en insectos relacionados, los tejidos metabólicamente muy activos (como las glándulas salivales y el intestino) crecen mediante el incremento en el tamaño de sus células más que aumentando el número de células. Este proceso genera células gigantes cuyo volumen es miles de veces mayor de lo normal. El desarrollo de estas células gigantes está acompañado de sucesivas rondas de replicación del DNA, pero debido a que esta replicación se da en células que no están en división, las nuevas cromátidas se acumulan en cada núcleo y se alinean en paralelo para dar lugar a estructuras con múltiples hebras denominadas **cromosomas politénicos**. Cada cromosoma politénico contiene múltiples cromátidas generadas durante la replicación de ambos miembros de cada par de cromosomas homólogos. Los cuatro cromosomas politénicos gigantes encontrados en las glándulas salivares de las larvas de *Drosophila*, por ejemplo, están generados por diez rondas de replicación. Diez duplicaciones de cada cromátida producen $2^{10} = 1.024$ cromátidas, de manera que un cromosoma politénico que contiene los dos miembros de un par de cromosomas homólogos poseería un total de ¡$1.024 + 1.024 = 2.048$ cromátidas alineadas muy cerca unas de otras! En cada cromosoma politénico se encuentra un determinado patrón de bandas oscuras.

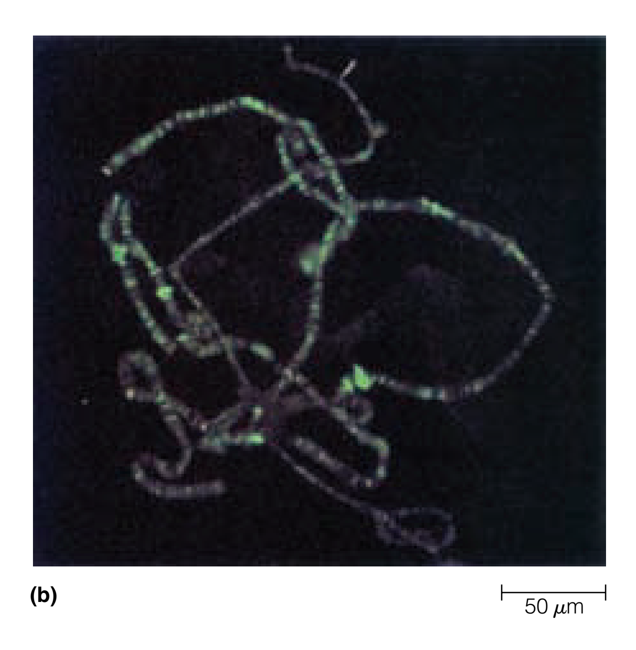
Los cromosomas politénicos son, por lo tanto, enormes estructuras que miden cientos de micras de longitud y varias micras de ancho —son unas diez veces más largos y cientos de veces más anchos que los cromosomas en metafase de una típica célula eucariota—. La micrografía de la Figura 23.15 muestra varios cromosomas politénicos de los núcleos de las células de las glándulas salivares de *Drosophila*.

Cada banda representa un dominio de la cromatina que está altamente condensado en comparación con la cromatina de las regiones entre dos bandas. La activación de los genes de una determinada banda hace que las hebras de cromatina compactada se desenrollen y se expandan hacia fuera, lo que da lugar al deshilachamiento o «**puff**» **del cromosoma**. La Figura 23.16 muestra una visión más clara de la región que contiene los puffs en un cromosoma politénico. Estos deshilachamientos constan de bucles de DNA que están menos condensados que el DNA de cualquier otro punto del cromosoma. Aunque los puffs no son sólo sitios de transcripción génica a lo largo del cromosoma politénico, la ausencia de condensación cromosómica en ellos se correlaciona con el incremento de la actividad transcripcional de estos sitios.

A medida que la larva de *Drosophila* se desarrolla, cada uno de los cromosomas politénicos de los núcleos de la glándula salival, experimentan cambios reproducibles en los patrones de sus puffs, bajo el control de una hormona esteroídica del insecto denominada *ecdisona*. Esta hormona funciona uniéndose, y por lo tanto activando, a una proteína reguladora que estimula la transcripción de ciertos genes. (Es similar a la acción de las hormonas esteroídicas humanas, como veremos más adelante en este capítulo). Parece, en otras palabras, que los patrones característicos de puffs, que se ven durante el desarrollo de la larva de *Drosophila*, son manifestaciones visuales directas de la descondensación selectiva y de la transcripción de segmentos específicos de DNA, de acuerdo con un programa de desarrollo determinado genéticamente.



(a)



(b)

Figura 23.15 Actividad transcripcional de cromosomas politénicos. (**a**) Micrografía de contraste de fase mostrando varios cromosomas politénicos de la glándula salival de una larva de *Drosophila*. El patrón de bandas es característico de cada cromosoma, de forma que se pueden identificar bandas individuales. (**b**) Los mismos cromosomas vistos al microscopio de fluorescencia, tras la incubación con anticuerpos fluorescentes que se unen específicamente a la RNA polimerasa II. Los cromosomas están iluminados en los sitios donde se localizan las moléculas de RNA polimerasa II, es decir, donde se está dando la transcripción. La larva de la que se obtuvieron estos cromosomas fue sometida a elevadas temperaturas durante un breve espacio de tiempo para activar los genes que codifican proteínas de choque térmico.

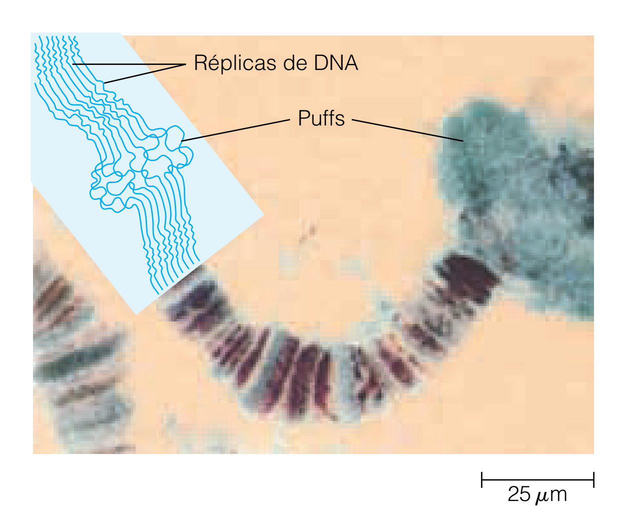


Figura 23.16 «Puffs» en los cromosomas politénicos. Los «puffs» o deshilachamientos son regiones en las que la cromatina transcripcionalmente activa se encuentra menos condensada, como se indica en el esquema. La micrografía óptica muestra parte de un cromosoma politénico.

La sensibilidad a la DNasa I proporciona otra evidencia del papel de la descondensación de la cromatina en el control genómico

La ausencia de cromosomas politénicos en la mayoría de las células eucariotas hace difícil la visualización de la descondensación de la cromatina en regiones de genes activos. Sin embargo, existen otras evidencias que apoyan la idea de que la descondensación de la cromatina está generalmente asociada a la transcripción génica. La *DNasa I*, una endonucleasa aislada del páncreas, es una herramienta particularmente útil para la investigación. En experimentos in vitro, la DNasa I a bajas concentraciones degrada preferentemente DNA transcripcionalmente activo en la cromatina. El incremento en la sensibilidad de estas regiones de DNA a la degradación por DNasa I es una evidencia de que el DNA está desenrollado.

La Figura 23.17 ilustra un experimento típico de sensibilidad a la DNasa I, centrado en el gen de la globina del pollo, una de las subunidades polipeptídicas de la hemoglobina. El gen de la globina está expresado activamente en el núcleo de los eritrocitos del pollo. A diferencia de los eritrocitos de muchos otros vertebrados, los eritrocitos aviares maduros retienen el núcleo. Si se aíslan estos núcleos y se digiere la cromatina con DNasaI, el gen de la globina se digiere por completo, a concentraciones de DNasa I, que no afectan al gen de la globina de otros tejidos, como el de los del oviducto. Como puede imaginar, un gen que no está activo en los eritrocitos (por ejemplo, el gen de la ovoalbúmina, una proteína de la clara del huevo) no es digerido por la DNasa I, a concentraciones bajas. Ocurre lo contrario cuando se lleva a cabo el mismo procedimiento, usando cromatina aislada del oviducto, donde el gen de la ovoalbúmina está expresado y el gen de la globina está inactivo. En este caso, el gen de la ovoalbúmina es más sensi-

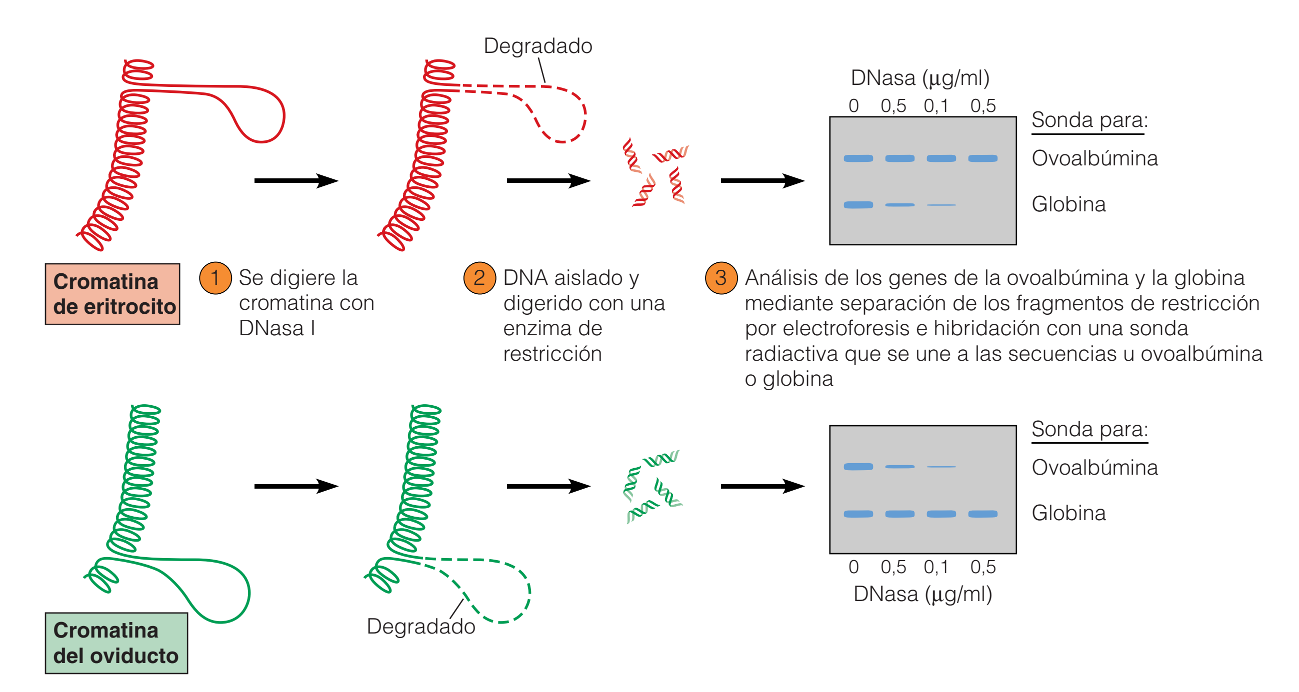


Figura 23.17 **Sensibilidad a digestión con DNasa I de los genes activos de la cromatina.** La configuración de la cromatina de los genes activos se puede ensayar exponiendo los núcleos celulares a DNasa I. Como toda endonucleasa, la DNasa I digiere el DNA cortando repetidamente enlaces fosfodiéster internos. Sin embargo, el DNA en la cromatina condensada está protegido del ataque de la DNasa I, presumiblemente porque está altamente enrollado y asociado a proteínas. El experimento que se muestra en la figura usa cromatina de dos tipos celulares distintos, eritrocitos de pollo y células del oviducto, y se centra en los genes de la globina y la ovoalbúmina, que se expresan en eritrocitos y células del oviducto, respectivamente. En el paso ①, la cromatina se digiere con una concentración baja de DNasa I, que digiere preferentemente el DNA en regiones desenrolladas de la cromatina. En el paso ②, se eliminan las proteínas de la cromatina y el DNA se purifica y digiere con una enzima de restricción que liberará un fragmento de DNA que contiene un gen de la globina u ovoalbúmina intacto (si no ha sido digerido por la DNasa I). Finalmente, la presencia de ese fragmento de restricción se detecta en el paso ③, separando los fragmentos de DNA mediante electroforesis, transfiriendo los fragmentos separados a un papel de filtro (Southern blot) e hibridando con sondas de DNA para los genes de la ovoalbúmina y la globina radiactivas. Observe que el DNA aislado de la cromatina de eritrocitos y tratado con cantidades crecientes de DNasa I contiene cantidades progresivamente menores del fragmento de restricción intacto con el gen de la globina, y se obtuvieron resultados comparables con el gen de la ovoalbúmina en la cromatina del oviducto. Por el contrario, incluso a concentraciones altas, la DNasa I no tiene efecto en el gen de la globina de la cromatina del oviducto o en el gen de la ovoalbúmina de la cromatina de los eritrocitos. En otras palabras, los genes son más susceptibles al ataque de la DNasa I en tejidos en los que estos genes son transcritos activamente.

ble que el gen de la globina a la digestión por DNasa I. Estos datos demuestran que la transcripción del DNA eucariota se relaciona con el incremento en la sensibilidad a la digestión por la DNasa I.

Los resultados de estos experimentos son compatibles con dos explicaciones alternativas: o bien la cromatina desenrollada es necesaria para que los factores de transcripción y la RNA polimerasa accedan al DNA, o bien la unión de estas proteínas al DNA genera el desenrollamiento. La cuestión ha sido resuelta por estudios que demuestran que la sensibilidad a la DNasa I se detecta en genes que están siendo transcritos activamente, en genes que se han transcrito recientemente pero que ya no están activos, y en secuencias de DNA localizadas cerca de los genes de los dos tipos anteriores. Estas observaciones sugieren que la sensibilidad a la DNasa I no está causada por el proceso de transcripción en sí mismo, sino que refleja una estructura alterada de la cromatina en regiones asociadas con genes activos o potencialmente activos. Presumiblemente, esto significa que el desenrrollamiento de la cromatina es un prerrequisito —y no una consecuencia— para la activación transcripcional.

La DNasa I también se ha usado en otro tipo de experimentos. Cuando se trata el núcleo con concentraciones muy bajas de DNasa I, se pueden detectar **sitios de hipersensibilidad a DNasa I**, posiciones específicas en la cromatina que son especialmente susceptibles a la digestión. Los sitios de hipersensibilidad suelen encontrarse algunos cientos de bases por delante de los sitios de iniciación de la transcripción de genes activos y son unas diez veces más sensibles a la digestión por DNasa I que el total del DNA asociado a estos genes. La idea de que los sitios de hipersensibilidad a la DNasa I pueden ser regiones que libres de nucleosomas, surgió de estudios con el virus eucariota SV40. Cuando el virus SV40 infecta a la célula huésped, su molécula de DNA circular permanece asociada a histonas y forma los típicos nucleosomas que se observan al microscopio electrónico.

Sin embargo, una pequeña región del DNA viral permanece completamente desenrollada y libre de nucleosomas (Figura 23.18). Esta región, que incluye varios sitios hipersensibles a DNasa I, contiene secuencias de DNA que se unen a proteínas reguladoras implicadas en la activación de la transcripción.

La metilación del DNA está asociada a regiones inactivas del genoma

Otra forma de regular la disponibilidad de distintas regiones del genoma es la **metilación del DNA**, es decir, la adición de grupos metilo a determinados grupos de citosina del DNA. El DNA de la mayoría de los vertebrados contiene pequeñas cantidades de citosina metilada, que tienden a agruparse en regiones no codificantes en el extremo 5′ de los genes. Es más, los patrones de metilación se mantienen tras la replicación del DNA, porque la enzima responsable de su metilación, es específica de las citosinas localizadas en secuencias 5′–CG–3′apareadas con las secuencias 3′–GC–5′ complementarias, que ya están metiladas. Esto significa que si la hebra vieja de una nueva doble hélice tiene una secuencia 5′–CG–3′, entonces la secuencia 3′–GC–5′ complementaria en la nueva hebra, será una diana de metilación.

Dado que los patrones de metilación tienden a ser transmitidos a sucesivas generaciones de células, proporcionan un mecanismo estable para crear **cambios epigenéticos,** es decir, cambios en la expresión génica que no implican cambios en la secuencia de bases del gen correspondiente. Un sorprendente ejemplo implica a los cromosomas X de las hembras de mamíferos, que heredan un cromosoma X de cada uno de sus dos parentales. Los machos poseen sólo un cromosoma X, de manera que existe un desequilibrio potencial en la expresión de los genes X entre los machos y las hembras. La solución de la naturaleza a este problema es la inactivación al azar uno de los dos cromosomas X en las hembras durante el desarrollo embrionario. Durante este proceso de *inactivación del cromosoma X*, el DNA del mismo se metila extensamente, las fibras de cromatina se condensan en una densa masa de herocromatina y cesa la transcripción génica. Cuando se examinan al microscopio células en interfase, el cromosoma X inactivo se visualiza como un punto oscuro denominado *cuerpo de Barr*. Una vez que el cromosoma X se ha inactivado en una célula determinada, el mismo cromosoma X permanece inactivo en todas las células producidas en las sucesivas divisiones. El resultado neto es que las hembras, como los machos, contienen sólo un cromosoma X activo por cada célula adulta.



Figura 23.18 La molécula de DNA circular del virus SV40 de una célula infectada. En esta micrografía electrónica de alta resolución de una molécula de DNA de SV40, la llave señala una pequeña región del lado derecho de la molécula que carece de nucleosomas. Esta región corresponde a la localización de varios sitios hipersensibles a DNasa I (TEM).

Otra evidencia que sugiere que la metilación del DNA influye en la actividad génica vino de los estudios con las endonucleasas de restricción *MspI* y *HpaII*. Estas dos enzimas cortan el sitio –CCGG–; sin embargo *HpaII* sólo funciona si la C central no está metilada, mientras *MspI* corta si tanto si la C está metilada como si no. La comparación de los fragmentos de DNA generados por estas dos enzimas ha confirmado que algunos sitios del DNA exhiben patrones de metilación específicos de tejido —es decir, los sitios se metilan en algunos tejidos pero no en otros—. En general, estos sitios no están metilados en los tejidos donde el gen es activo o potencialmente activo, y metilados en los tejidos donde el gen es inactivo. Por ejemplo, las secuencias CG localizadas cerca del extremo 5′ del gen de la globina están metiladas en células que no producen hemoglobina pero no lo están en los glóbulos rojos.

Otra prueba que apoya la conclusión de que la disminución en la metilación del DNA incrementa la actividad génica, procede de estudios con *5-azacitidina*, una droga que pueden incorporar las células en el DNA, en lugar de citosina. A diferencia de la citosina, la 5-azacitidina no puede ser metilada, porque contiene un átomo de nitrógeno en lugar de carbono en el sitio donde normalmente se da la metilación. La exposición de las células a 5-azacitidina produce, por lo tanto un estado de baja metilación que se mantiene durante varias generaciones después de que se ha eliminado la droga. Este estado de baja metilación está asociado con la activación de la transcripción de varios tipos de genes, incluyendo algunos localizados en la heterocromatina de los cromosomas X inactivados.

En conjunto, las observaciones anteriores sugieren que la metilación del DNA suprime la transcripción génica. Aunque no se conoce bien el mecanismo de este efecto, se

ha propuesto que la metilación promueve la condensación de la cromatina, haciendo al DNA menos accesible a factores de transcripción y a la RNA polimerasa. Pero debemos ser cuidadosos en no llevar este tipo de especulaciones muy lejos ya que se conocen ejemplos de secuencias de DNA metiladas que son transcritas y de secuencias no metiladas que no lo son. Es más, la ausencia de metilación del DNA varía significativamente entre los eucariotas, siendo frecuente en mamíferos y plantas superiores, pero poco común en eucariotas más sencillos como *Drosophila* y levaduras. Así, más que representar un componente esencial de la regulación génica en eucariotas, la metilación del DNA es sólo uno de los múltiples factores que contribuyen al control global de la expresión génica.

Los cambios en las histonas, las proteínas HMG y la matriz nuclear están asociados con regiones activas del genoma

Además de alteraciones en la sensibilidad a DNasa I y la metilación del DNA, hay otras propiedades diferenciales asociadas con la organización estructural de regiones del genoma activamente transcritas. Por ejemplo, dado el importante papel de las histonas en la organización de la cromatina, se esperarían cambios en la estructura de las histonas de las regiones de los genes activos. Uno de los mecanismos de alteración de la estructura de las histonas es la *acetilación*, la adición de grupos acetilo a cadenas laterales de los aminoácidos de las histonas. La evidencia de que la acetilación de las histonas está incrementada en la cromatina activa se obtuvo a partir de experimentos en los que la cromatina se incubó con DNasa I para degradar selectivamente genes que son transcripcionalmente activos. Este tratamiento produce la liberación de la forma acetilada de las histonas H3 y H4, lo que sugiere que éstas están asociadas preferentemente a los nucleosomas de genes activos.

En otros estudios que apoyan esta idea, se utilizó butirato sódico, una sal de ácido graso que inhibe la eliminación de grupos acetilo de histonas y por lo tanto hace que las histonas estén excesivamente acetiladas. La cromatina aislada de las células tratadas con butirato sódico es más susceptible a la digestión por DNasa I que la normal, lo que sugiere que la acetilación de las histonas altera la estructura nucleosomal de forma que incrementa la susceptibilidad del DNA al procesamiento enzimático. Estos cambios en la estructura del nucleosoma, inducidos por metilación, podrían producir una pérdida del empaquetamiento de la cromatina que facilitara el acceso de los factores de transcripción a los promotores del gen.

Además de la acetilación, las cadenas laterales de los aminoácidos de las histonas están sujetas a varias modificaciones, que incluyen la fosforilación y la metilación, que podrían alterar la estructura de la cromatina, y por lo tanto influir en la actividad génica. Por ejemplo, la ausencia de acetilación de las histonas, combinada con la presencia de metilación, está asociada con la condensación de la cromatina para dar lugar a la heterocromatina inactiva. Estas observaciones han planteado la hipótesis de la existencia de un *código de histonas*, en el que los diferentes patrones de modificación de histonas, son leídos por otras proteínas, como señales para modificar la estructura de la cromatina y la actividad génica. Otra evidencia de que las histonas afectan a la estructura de la cromatina y a su actividad, es la observación de que la histona H1 está normalmente ausente de regiones transcripcionalmente activas de la cromatina. Ya que la histona H1 es necesaria para el plegamiento de la cromatina en fibras de cromatina de 30 nm, la ausencia de la histona H1 podría ayudar a mantener la cromatina activa en forma no enrollada de fibras de 10 nm.

Una característica de la cromatina transcripcionalmente activa es el alto contenido en **proteínas del grupo de alta movilidad (HMG),** un conjunto de proteínas no histónicas, cuyo nombre refleja su rápida movilidad durante la electroforesis. Si las proteínas HMG se eliminan de la cromatina aislada, los genes pierden su sensibilidad a DNasa I. La sensibilidad a DNasa I puede recuperarse volviendo a añadir las proteínas HMGN (un subconjunto de las proteínas HMG, anteriomente conocido como HMG-14/17). Si se aíslan de un tejido las proteínas HMGN y se añaden a cromatina sin HMG derivada de otro tejido, el patrón de genes sensibles a DNasa I es semejante al del tejido del que procede la cromatina, no del que proceden las proteínas HMGN. Por ejemplo, si la cromatina de hígado sin HMG se mezcla con HMGNs derivadas del cerebro, el patrón de genes sensibles a DNasa I en la cromatina resultante, se asemeja al del hígado, no al del cerebro. Esto significa que la cromatina debe presentar diferencias específicas de tejido que son reconocidas por las HMGNs, permitiendo a estas proteínas unirse selectivamente a genes que normalmente son capaces de activarse en cualquier tejido. Se piensa que la unión de HMGN incrementa la sensibilidad a DNasa I ayudando a las fibras de cromatina a desenrollarse en una configuración más abierta, quizá desplazando a la histona H1 de la fibra de 30 nm.

Finalmente, los genes transcritos activamente presentan una estrecha asociación estructural con la matriz nuclear. Esta propiedad fue establecida por primera vez en el gen del pollo que codifica la ovoalbúmina, una proteína que sólo se forma en células que tapizan el oviducto. En un conjunto de estudios, se aisló la matriz nuclear de células del oviducto del pollo, que transcribían activamente el gen de la ovoalbúmina, y de células del hígado del pollo que no lo transcribían. Cuando se hibridó la pequeña cantidad de DNA que permanece asociada con la matriz nuclear después del aislamiento con secuencias del gen de la ovoalbúmina clonado, se vio que las secuencias de DNA de la ovoalbúmina estaban enriquecidas en las fracciones de la matriz nuclear aisladas del oviducto, pero no en las de hígado. En otras palabras, las secuencias de DNA que codifican la ovoalbúmina están estrechamente asociadas con la matriz nuclear de tejidos donde el gen de la ovoalbúmina

se transcribe activamente. Algunos estudios posteriores han revelado que el DNA transcripcionalmente activo está unido a la matriz nuclear por secuencias de DNA especiales denominadas *regiones de anclaje a la matriz (MARs)*.

Regulación de los genes eucariotas: control de la transcripción

Hemos descrito algunos de los cambios de regulación frecuentes en la composición y estructura del genoma. Sin embargo, la existencia de cambios estructurales asociados con regiones activas del genoma no resuelve la cuestión de cómo las secuencias de DNA contenidas en estas regiones son realmente seleccionadas para ser activas. La respuesta se encuentra en el control de la transcripción, el segundo nivel principal de control de la expresión génica en eucariotas (*véase* Figura 23.11).

Los distintos tipos celulares transcriben diferentes conjuntos de genes

Cuando consideramos el control transcripcional, llegamos a un nivel de la regulación génica cuyo conocimiento se ha desarrollado mucho en los últimos años. Una evidencia directa de la importancia de la regulación transcripcional en los eucariotas vino de los experimentos en los que se comparaba el RNA sintetizado *de novo* en el núcleo de distintos tejidos de mamíferos. Las células del hígado y del cerebro, por ejemplo, producen distintos conjuntos de proteínas, aunque existe un solapamiento considerable entre ambos conjuntos. ¿Cómo podemos determinar el origen de esta diferencia? Si las diferentes proteínas producidas por dos tipos celulares son un reflejo de *transcripción génica diferencial* —es decir, transcripción de distintos genes para producir distintos conjuntos de RNAs—, deberíamos ver las correspondientes diferencias entre las poblaciones de RNAs nucleares derivados de cerebro y células del hígado. Por otra parte, si todos los genes son transcritos igualmente en hígado y cerebro, encontraríamos pocas o ninguna diferencia entre las poblaciones de RNAs nucleares de los tejidos, y concluiríamos que las diferencias específicas de tejido en la síntesis de proteínas eran debidas a mecanismos postranscripcionales que controlan la posible transcripción de varios RNAs.

Una forma de distinguir entre estas alternativas es usar la técnica de *transcripción nuclear «run-on»*, que proporciona una instantánea de la actividad transcripcional que se está dando en el núcleo, en un determinado momento (Figura 23.19). Los núcleos transcripcionalmente activos

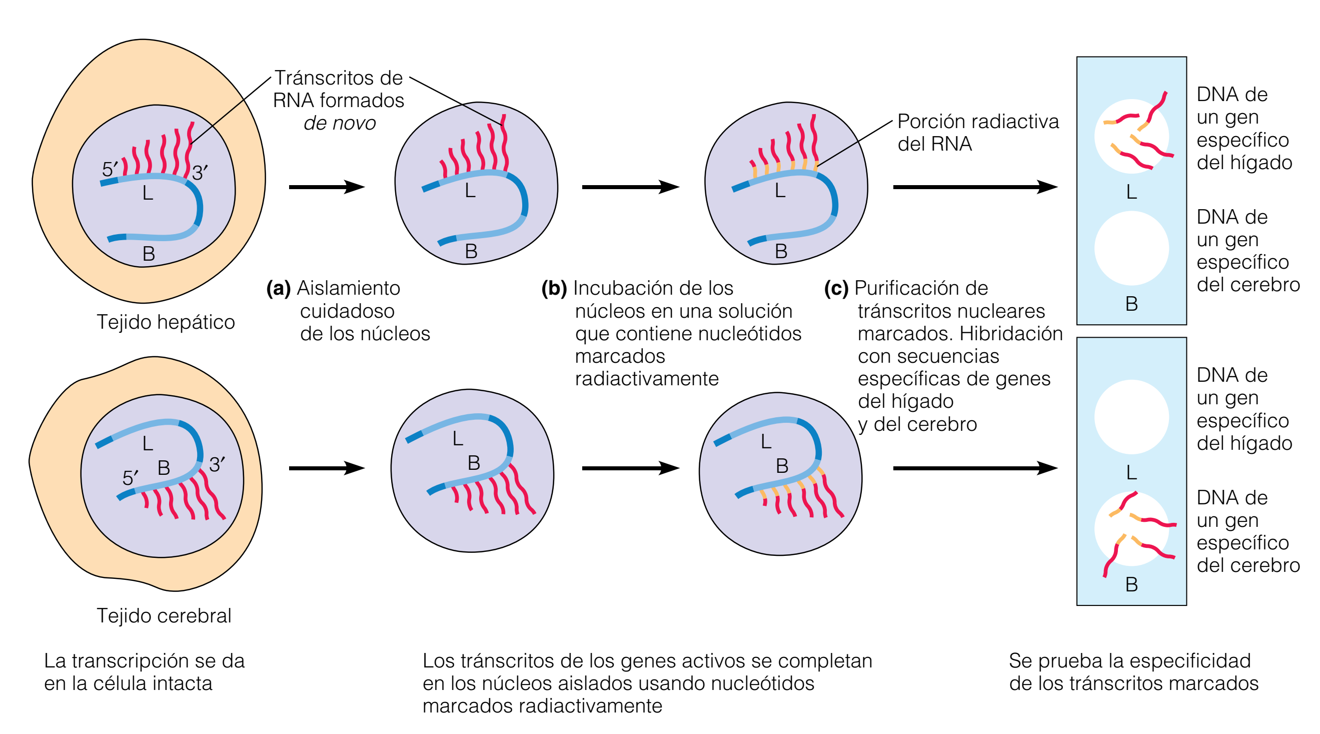


Figura 23.19 Demostración de la transcripción diferencial en ensayos de transcripción nuclear «run-on». (**a**) Los núcleos se aíslan cuidadosamente de tejido de hígado y cerebro. B representa un gen hipotético del DNA nuclear que se expresa sólo en el cerebro, y L es un gen que se expresa sólo en el hígado. (**b**) Los núcleos aislados se incuban en una solución que contiene ribonucleótidos marcados radiactivamente. Los nucleótidos marcados entran en los núcleos aislados, a través de los poros nucleares y se incorporan en los mRNAs, que están siendo sintetizados en los genes activos. Si los genes activos en hígado y cerebro son diferentes, algunas secuencias marcadas en los tránscritos nucleares del hígado faltarán en los tránscritos del cerebro, y viceversa. (**c**) La composición de la población de RNA marcada se comprueba permitiendo al RNA marcado hibridar con secuencias de DNA correspondientes a los distintos genes y que han sido unidos al papel de filtro que sirve de soporte. Los tránscritos de hígado marcados hibridan con un conjunto de genes distinto al de los tránscritos marcados de cerebro, lo que indica que difieren los genes que están activos en ambos tejidos.

son cuidadosamente aislados de las células y se les permite completar la síntesis de RNA en presencia de nucleósidos trifosfato marcados radiactivamente. Cuando este experimento se desarrolla utilizando células de hígado y cerebro, los nuevos RNAs transcritos en los núcleos del hígado, contienen secuencias de genes específicos del hígado, pero estas secuencias hepáticas no se detectan en los RNAs sintetizados por los núcleos aislados del cerebro. Análogamente, los nuevos RNAs (marcados radiactivamente) transcritos en los núcleos del cerebro contienen secuencias de genes específicos del cerebro, pero estas secuencias no se detectan en los RNAs marcados que sintetizan por los núcleos aislados del hígado.

La incapacidad de detectar la síntesis de RNA de genes específicos de hígado en los núcleos de células del cerebro y viceversa, sugiere que la expresión génica está regulada normalmente a nivel transcripcional en los eucariotas. En otras palabras, los diferentes tipos celulares transcriben conjuntos de genes, permitiendo así que cada tipo celular produzca las proteínas necesarias para llevar a cabo las funciones celulares específicas.

Los microarrays de DNA permiten monitorizar simultáneamente la expresión de miles de genes

Aunque las observaciones anteriores revelan que se transcriben distintos genes en distintos tipos celulares, no es fácil identificar qué genes en particular están o no activados. Un método para determinar si un gen está activo, es ensayar su correspondiente mRNA mediante el uso de una técnica que se ha dado en llamar *Northern blotting*, porque es esencialmente la «opuesta» al Southern blotting (una técnica de detección de DNA). En el Northern blotting, una muestra de RNA es separada por su tamaño mediante electroforesis y transferida a un papel especial. Este papel se expone luego a una sonda de DNA radiactiva que contiene la secuencia de interés, y se cuantifica la cantidad de mRNA midiendo la radiactividad.

Alternativamente, para monitorizar la expresión de cientos o incluso miles de genes de forma simultánea, se emplea la técnica denominada «**microarray**» **de DNA**. Un microarray de DNA es un chip muy fino, del tamaño de una uña, hecho de plástico o vídrio, al que se han unido en posiciones fijas (puntos), fragmentos de DNA correspondientes a varios genes de interés. Un microarray sencillo contiene 10.000 o más puntos, cada uno de ellos correspondiente a un gen particular. Para saber qué genes se están expresando en una determinada población celular, las moléculas de RNA (que son los productos de la transcripción génica) se aíslan de las células y se copian mediante una transcriptasa inversa en moléculas de cDNA de cadena sencilla, a las que después se une una sonda fluorescente. Cuando el microarray se expone al cDNA fluorescente, cada molécula de cDNA se unirá por complementariedad de bases al punto que contiene el gen que se está transcribiendo.

La Figura 23.20 muestra cómo se puede utilizar esta aproximación para comparar el patrón de expresión de dos poblaciones celulares distintas. En este ejemplo concreto, que compara la expresión génica en células cancerosas y normales, se han usado dos tipos distintos de sondas fluorescentes, una roja, para marcar cDNA derivado de células cancerosas y la otra verde, para marcar cDNA, derivado de las células normales correspondientes. Cuando los cDNAs verdes y rojos se mezclan y se colocan sobre el microarray, los rojos se unirán a los genes que se expresan en células cancerosas y los verdes a los que se expresan en células normales. Los puntos rojos, por tanto, representan un

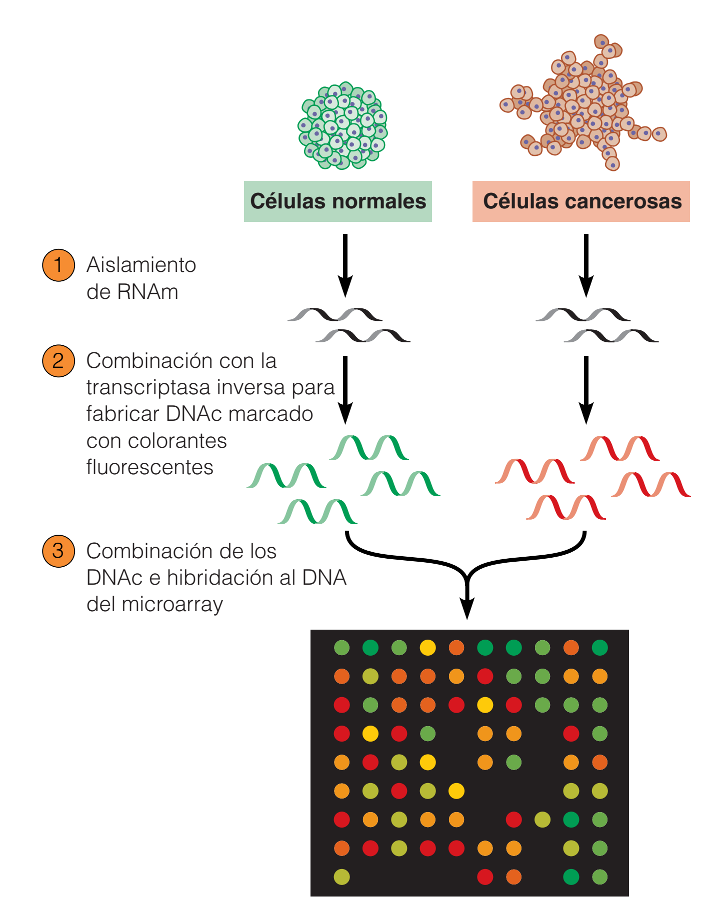


Figura 23.20 Uso de un microarray de DNA para determinar el perfil de los patrones de expresión de dos tipos celulares distintos. En este ejemplo se compara la expresión génica en células normales y cancerosas ① aislando mRNA de las dos poblaciones celulares ② usando la transcriptasa inversa para hacer copias de cDNA del mRNA, que están marcadas con un colorante verde para los cDNA normales y otro rojo para los cDNA de las células cancerosas. Se expone ③ después a la mezcla de las dos poblaciones de cDNA, un microarray de DNA que contiene miles de fragmentos de DNA que representan distintos genes (sólo se muestra una pequeña sección del microarray). Los puntos rojos representan los genes expresados preferentemente en células cancerosas, los puntos verdes representan los genes expresados preferentemente en células normales, los puntos amarillos representan los genes cuya expresión es similar en las dos poblaciones celulares, y las regiones oscuras (puntos ausentes) representan genes que no se expresan en ninguno de los dos tipos celulares.

mayor nivel de expresión en células cancerosas, los puntos verdes representan un mayor nivel de expresión en células normales, los puntos amarillos (una mezcla de las sondas roja y verde) representan los genes cuya expresión es aproximadamente similar, y los puntos negros (ausencia de fluorescencia) representan los genes que no se expresan en ningún tipo celular. Así, se puede comparar la expresión relativa de miles de genes midiendo la intensidad y el color de la fluorescencia de cada punto.

El uso de microarrays de DNA para determinar el perfil de expresión es una potente herramienta de investigación básica que también ha tenido aplicaciones clínicas. Por ejemplo, ciertos cánceres humanos que parecen ser alteraciones equivalentes cuando se observan al microscopio, presentan a veces distintos patrones de expresión génica cuando se examinan usando la tecnología de los microarrays de DNA. Esta información está empezando a permitir que se caractericen los cánceres de distintos pacientes de forma más precisa, mejorando las perspectivas de aplicar tratamientos personalizados que sean los más apropiados para cada individuo.

Los elementos proximales de control se sitúan cerca del promotor

En nuestra exposición de la forma de regulación transcripcional en los distintos tipos celulares, nos centraremos ahora en los genes que codifican proteínas, que son transcritos por la RNA polimerasa II. Como vimos en el Capítulo 21, la especificidad de la transcripción —es decir, el lugar donde se inicia— no está determinada por la RNA polimerasa en sí misma, sino por un conjunto variable de otras proteínas denominadas *factores de transcripción.* (A diferencia de los factores sigma procariotas, que también determinan la especificidad de la iniciación, ninguno de los factores de transcripción de eucariotas se considera una parte integrante de la molécula de la RNA polimerasa.) Los factores de transcripción expuestos en el Capítulo 21 eran *factores de transcripción generales*, que son esenciales para la transcripción de *todos* los genes transcritos por cualquier tipo de RNA polimerasa.

En los genes transcritos por la RNA polimerasa II, los factores generales de transcripción se ensamblan con la RNA polimerasa en el *núcleo del promotor*, una región del DNA localizada en las inmediaciones del punto de iniciación de la transcripción (*véase* Figura 21.13b). La interacción de los factores generales de transcripción y la RNA polimerasa con el núcleo del promotor, suele iniciar la transcripción sólo a un nivel «basal», de manera que se producen pocos tránscritos. Sin embargo, además del núcleo del promotor, la mayor parte de los genes que codifican proteínas tienen secuencias cortas de DNA situados por delante (y, en algunos casos, por detrás) del lugar al que se unen otros factores de transcripción, mejorando la eficiencia del núcleo del promotor. Cuando estos elementos de adicionales DNA son delecionados o mutados, la frecuencia y exactitud de la iniciación de la transcripción se reducen.

Para explicar estas secuencias reguladoras, usaremos el término **elementos proximales de control** para referirnos a las secuencias localizadas por delante («upstream») del núcleo del promotor, pero dentro de un radio de 100-200 pares de bases de éste. El número, la localización exacta y las identidades de estos elementos proximales de control varían en cada gen, pero hay tres tipos particularmente frecuentes: la *caja CAAT*, la *caja GC* y el *octámero* (los dos primeros se expusieron en el Capítulo 21 y se representan en la Figura 23.21). Los factores de transcripción que se unen selectivamente a uno de éstos, o a otros elementos de

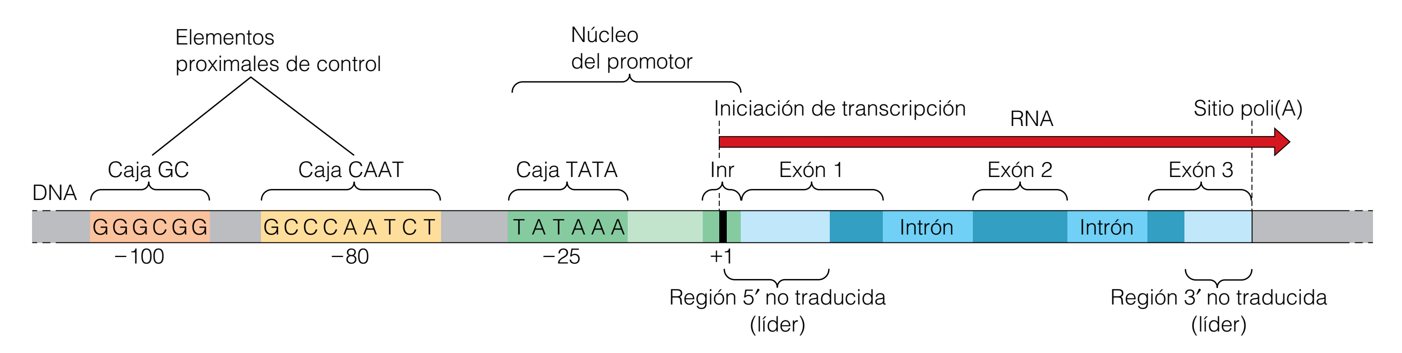


Figura 23.21 Anatomía de un gen eucariota típico, con su núcleo del promotor y su región de control proximal. Este diagrama (que no está a escala) representa un gen eucariótico típico que codifica una proteína y que es transcrito por la RNA polimerasa II. El promotor —denominado núcleo del promotor para distinguirlo de la región de control proximal— se caracteriza por una secuencia iniciadora (Inr) que rodea al punto de iniciación de la transcripción y una secuencia denominada caja TATA, localizada aproximadamente 25 pb por delante (en el extremo 5′) del punto de iniciación. El núcleo del promotor es el lugar donde se ensamblan los factores de transcripción y la RNA polimerasa, para que se inicie la transcripción. A unos 100 nucleótidos por delante del núcleo del promotor se encuentran varios elementos proximales de control, que estimulan la transcripción del gen interaccionando con factores reguladores de la transcripción. El número, la identidad y la localización exacta de los elementos proximales varían entre los distintos genes; aquí se muestra un caso sencillo, con una copia de cada uno de los elementos comunes, la caja GC y la caja CAAT. La unidad transcripcional incluye una región 5′no traducida (líder o cabecera) y una región 3′ no traducida (trailer o cola), que se transcriben e incluyen en el mRNA pero no se traducirán. Al final del último exón hay un sitio donde, en el tránscrito primario, se cortará el RNA y se añadirá un cola de poli(A).

control del DNA localizados fuera del promotor, se denominan **factores de transcripción reguladores**. Estos factores incrementan (o en algunos casos, disminuyen) la iniciación de la transcripción, aparentemente interaccionando con componentes del aparato de transcripción.

Dado que muchos de los elementos proximales de control del mismo tipo están asociados con distintos genes, algunos científicos consideran al promotor de la RNA polimerasa II como una región que incluye los elementos proximales de control. Sin embargo, las combinaciones y localizaciones concretas de estos elementos son específicas de cada gen.

Los potenciadores y los silenciadores están localizados a distancias variables del promotor

Los elementos proximales de control, como la mayoría de los elementos de control procariotas, se localizan cerca del núcleo del promotor, por delante del mismo. Un segundo tipo de secuencias de control del DNA se localiza, tanto por delante, como por detrás de los genes que regulan y generalmente lejos del promotor. Este segundo tipo de región de control se denomina **potenciador** o «enhacer», si estimula la transcripción y **silenciador** si la inhibe. Originalmente estas secuencias de control fueron llamadas, *elementos distales de control* porque podían funcionar a distancias superiores a 70.000-80.000 pb del promotor que regulan. Sin embargo, la característica distintiva de estas secuencias no es la distancia que les separa del promotor donde se localizan, sino el hecho de que su posición relativa al promotor puede variar significativamente y su orientación puede ser incluso inversa, sin interferir en su capacidad para regular la transcripción. Así, los potenciadores y los silenciadores no tienen por qué estar localizados a grandes distancias del promotor. Pueden estar localizados bastante del mismo, y a veces se pueden encontrar incluso *dentro* de los genes; un ejemplo de ello es que se ha encontrado un potenciador dentro de uno de los intrones de ciertos genes de anticuerpos.

Consideraremos primero los potenciadores, pues se conocen mejor que los silenciadores. Los potenciadores, con secuencias específicas variables pero con características comunes, están asociados con muchos genes eucariotas. Un potenciador típico contiene varios elementos de control distintos. Cada uno de ellos es una secuencia corta de DNA, que sirve como sitio de unión para varios factores de transcripción reguladores. Algunas de estas secuencias pueden ser idénticas a los elementos proximales de control; el octámero y la caja GC, por ejemplo, pueden actuar como elementos proximales de control y como potenciadores. Para que un potenciador funcione, deben estar presentes los factores de transcripción reguladores, que se unen a sus distintos elementos de control. Dado que los potenciadores están implicados en la activación de la transcripción, estos factores de transcripción reguladores, se denominan **activadores**.

Para estudiar las propiedades de los potenciadores, los investigadores han usado técnicas de DNA recombinante para alterar la localización y la orientación del potenciador respecto al gen que regulan. Como se muestra en la Figura 23.22, estos estudios revelan que los potenciadores pueden funcionar apropiadamente cuando se recolocan a distancias variables del punto de iniciación de la transcripción, siempre que esté presente el promotor (Figura 23.22d y e). La actividad se mantiene incluso cuando la orientación del potenciador está invertida respecto al inicio del gen (Figura 23.22f) o cuando el potenciador se recoloca *por detrás* del extremo 3′del gen (Figura 23.22g). Estas propiedades se suelen usar para distinguir potenciadores de elementos proximales de control, cuyas localizaciones concretas dentro del DNA tienden a ser más críticas para su función. Sin embargo, a medida que se han ido descubriendo e investigando más potenciadores y elementos proximales de con-

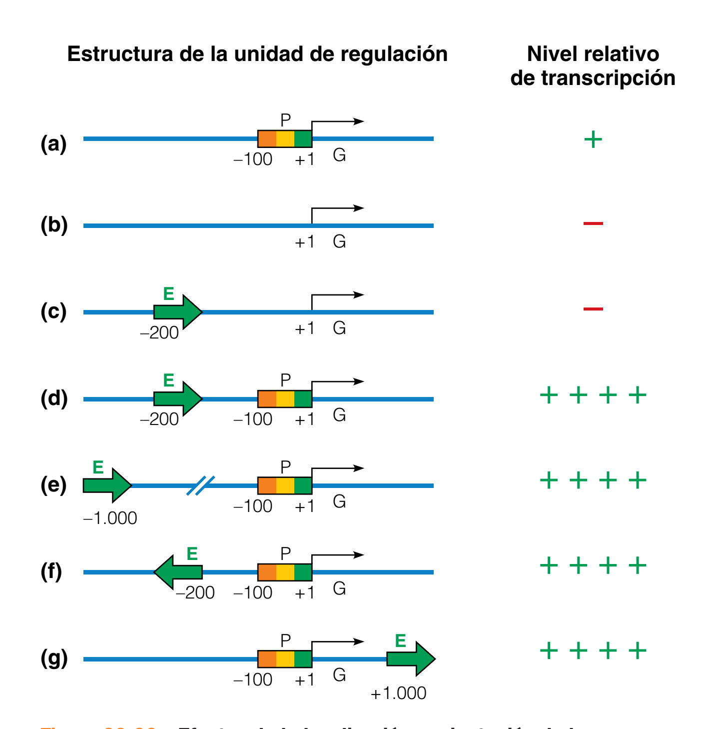


Figura 23.22 Efectos de la localización y orientación de los potenciadores. Se han utilizado técnicas de DNA recombinante para alterar la orientación y localización de los elementos de control del DNA, para estudiar el efecto del cambio en el nivel de transcripción del gen. Las flechas negras indican la dirección de transcripción del gen G, con el punto de iniciación marcado como +1. Los otros puntos indican las posiciones de los nucleótidos respecto al punto de iniciación. (**a**) El núcleo del promotor (P), en su típica localización por delante del gen G, permite que se dé un nivel basal de transcripción. (**b**) Cuando se elimina el promotor del gen, no se da la transcripción. (**c**) Un único potenciador (E) no puede sustituir a la región promotora, pero (**d**) combinando el potenciador con el núcleo del promotor, se produce un nivel de transcripción significativamente superior al que produce el promotor solo. (**e**) Este incremento en la transcripción se observa cuando se desplaza el potenciador a posiciones más adelantadas, (**f**) cuando se invierte su orientación, e incluso cuando (**g**) se desplaza al extremo 3′ del gen.

trol, se hacen menos claras las diferencias entre ambos elementos, y ahora parece que existe un amplio espectro de elementos de control transcripcional con propiedades solapantes. En un extremo están ciertos elementos proximales de control que deben estar colocados con precisión en sus posiciones específicas cerca del promotor —en estos casos, moverlos más de 15-20 pb del promotor hace que pierdan su influencia—. En el otro extremo están los potenciadores cuyas posiciones pueden variar mucho, hasta decenas de miles de nucleótidos más allá del promotor, sin interferir en su capacidad de activar la transcripción.

Aunque no están tan extendidos o bien conocidos como los potenciadores, los silenciadores parecen compartir muchas de las características de los potenciadores, excepto que inhiben en lugar de activar la transcripción. Dado que la unión de silenciadores a factores de transcripción reguladores reduce, en lugar de incrementar, las tasas de transcripción génica, estos factores se denominan **represores** eucariotas. (Aunque se parezcan a los represores procariotas en que desactivan la transcripción, los mecanismos de los eucariotas son algo distintos y más variados.) Vimos un ejemplo de silenciadores al principio del capítulo cuando estudiamos los genes *SIR*, que producen proteínas que inhiben la transcripción de los genes de tipo de apareamiento HML*α* y HMR*as* por unión a las secuencias de DNA que rodean a estos dos genes. Las proteínas producidas por los genes *SIR* son ejemplos de represores, y los sitios del DNA a los que se unen estos represores, localizados cerca del HML*α* y HMR*a*, son ejemplos de silenciadores.

Los coactivadores median la interacción entre los factores de transcripción reguladores y el complejo de la RNA polimerasa

Dado que los potenciadores y los silenciadores pueden encontrarse lejos de los genes que controlan, se plantea la cuestión de cómo se puede llevar a cabo esa regulación a distancias tan largas. Para contestar esta cuestión, nos centraremos de nuevo en los potenciadores (los silenciadores parecen presentar un comportamiento similar). Hay dos principios básicos que gobiernan la interacción entre los potenciadores y los genes que regulan. Primero, la torsión del DNA puede llevar al potenciador a las proximidades de un promotor, incluso aunque se encuentren apartados en términos de distancia lineal a lo largo de la doble hélice. Y segundo, una serie de proteínas **coactivadoras** median la interacción entre activadores unidos al potenciador y el complejo de la RNA polimerasa asociado al promotor.

Hay varios tipos de coactivadores que intervienen en estas interacciones. Algunos están implicados en la modificación de la estructura del nucleosoma para hacer al promotor más accesible a la maquinaria transcripcional. Por ejemplo, la enzima **histona acetiltransferasa (HAT)** es un coactivador que añade grupos acetilo a histonas y por lo tanto, promueve la condensación de la cromatina. Otro grupo de coactivadores están implicados en la remodelación de la cromatina —es decir, alteran la estructura provocando la salida de nucleosomas, de forma que los factores de transcripción puedan tener acceso a sus dianas en la región promotora de un gen—. Hay varias familias distintas de proteínas remodeladoras de la cromatina, entre las que la familia **SWI/SNF** es la mayor. Finalmente, un gran complejo multiproteico, denominado **Mediador,** funciona como un coactivador actuando como un puente que conecta a las proteínas activadoras asociadas al potenciador con la RNA polimerasa, y por lo tanto conectando los potenciadores con los componentes implicados en la iniciación de la transcripción.

La Figura 23.23 muestra cómo estas interacciones pueden desencadenar la activación génica. En el paso ①, un grupo de proteínas activadoras se une a sus respectivos elementos de control dentro del potenciador, formando un complejo multiproteico denominado «*enhanceosoma*». Una o más de estas proteínas activadoras hacen que el DNA se doble, generando un bucle que aproxima al potenciador al núcleo del promotor. En el paso ②, los activadores interaccionan con cofactores como las proteínas remodeladoras de la cromatina (SWI/SNF) y la histona acetiltransferasa (HAT), que altera la estructura de la cromatina haciendo a la región promotora del DNA más accesible. Finalmente, los activadores se unen al mediador (paso ③), que facilita el correcto posicionamiento de la RNA polimerasa y de los factores de transcripción en el promotor y permite, por tanto, que empiece la transcripción.

La secuencia de procesos y el conjunto de componentes implicados en el ejemplo anterior representan un modelo general, cuyos detalles varían entre los distintos genes y proteínas reguladoras. Pero estos detalles tienen menos importancia que la idea fundamental: cuando las proteínas activadoras de un determinado gen están presentes en la célula, su unión a un potenciador puede facilitar las interacciones con varios coactivadores que a su vez facilitan la formación del complejo de transcripción en el promotor, lo que tiene como resultado una iniciación de la transcripción más eficiente. Así, la transcripción diferencial dentro de una célula está determinada en gran medida por los activadores que la célula fabrica (así como por factores que controlan la actividad de los activadores, un tema que trataremos en breve).

Actuación conjunta de los elementos de control del DNA y de los factores de transcripción

El descubrimiento de que existen múltiples elementos de control y factores de regulación de la transcripción implicados en el control de la transcripción de los genes eucariotas, ha llevado a la proposición del **modelo combinatorial de regulación génica**. Este modelo propone que un número relativamente pequeño de elementos de control

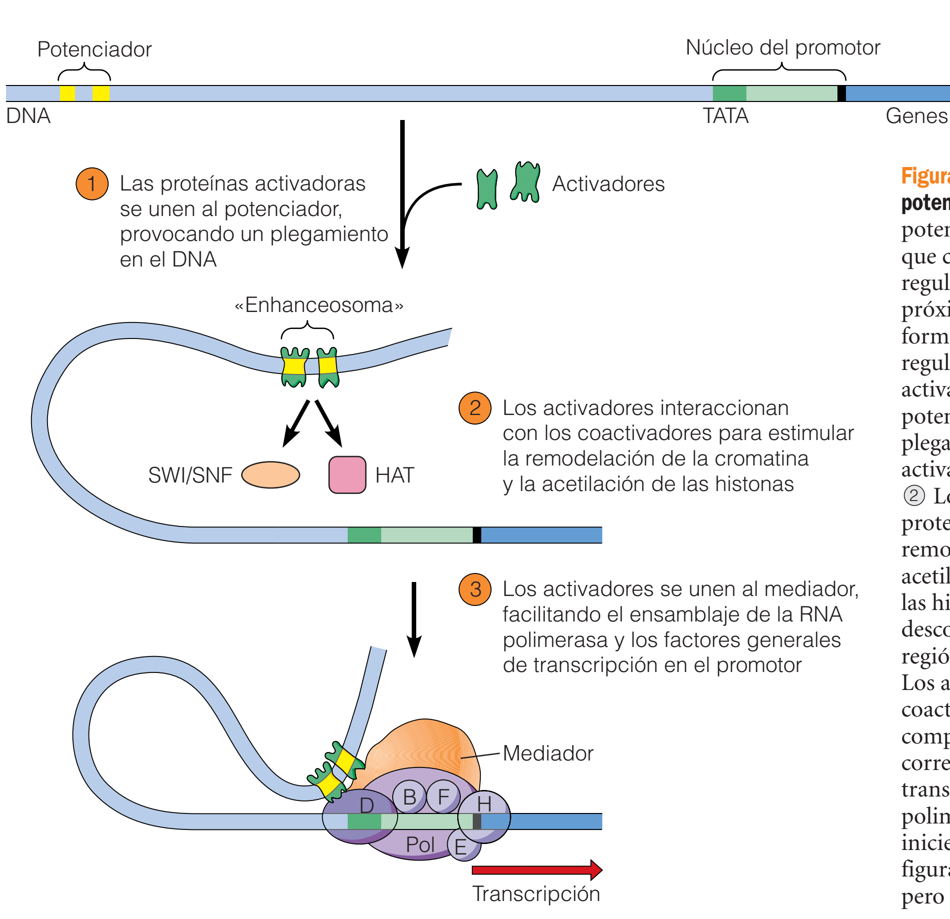


Figura 23.23 Modelo de acción para los potenciadores. En este modelo, un potenciador localizado a gran distancia del gen que codifica para la proteína y que está regulado por dicho potenciador, se sitúa próximo al núcleo del promotor por la formación de un bucle. ① Los factores de regulación de la transcripción, denominados activadores, se unen primero a los elementos potenciadores, desencadenando un plegamiento en el DNA, que sitúa a los activadores más cerca del núcleo del promotor ② Los activadores interaccionan entonces con proteínas coactivadoras como SWI/SNF, que remodela la cromatina, y HAT (histona acetiltransferasa), que cataliza la acetilación de las histonas. El efecto neto es una descondensación de la cromatina, que hace a la región promotora del DNA más accesible. ③ Los activadores se unen después a otro coactivador denominado Mediador, y el complejo activador-Mediador facilita el correcto posicionamiento de los factores de transcripción generales y de la RNA polimerasa en el promotor, permitiendo que se inicie la transcripción. Para simplificar, la figura se ha dibujado sólo con dos activadores, pero están implicados una docena o más.

del DNA y factores de transcripción diferentes, actuando en distintas combinaciones, puede establecer patrones altamente específicos y precisos de expresión génica en distintos tipos celulares. De acuerdo con este modelo, un gen se expresa al máximo nivel sólo cuando el conjunto de factores de transcripción producidos por un tipo celular incluye todos los factores reguladores que se unen a los elementos de control positivo de ese gen.

El modelo empieza asumiendo que algunos factores de transcripción están presentes en muchos tipos celulares. Entre ellos están los factores generales de transcripción, requeridos para la transcripción en todas las células, además de cualquier factor regulador necesario para la transcripción de genes constitutivos y otros genes que se expresan frecuentemente. Además, la transcripción de genes que codifican proteínas específicas de tejido, requiere la presencia de factores de transcripción o combinaciones de ellos, que son únicos en los distintos tipos celulares. Para ilustrar este concepto, la Figura 23.24 muestra cómo este modelo permitiría a las células del hígado producir grandes cantidades de proteínas como la albúmina, pero no permitiría la producción significativa de estas proteínas en otros tejidos, como el cerebro. La versión original del modelo combinatorial fue del «todo o nada», que proponía que la transcripción de un gen no se puede iniciar, a menos que esté presente todo el conjunto de factores de regulación de la célula. Ahora se considera más probable que exista un continuo en la eficiencia de la iniciación que va desde un nivel basal, que se da cuando *no* hay factores de regulación presentes, hasta un nivel máximo, que sólo se da cuando está presente el conjunto de factores reguladores.

Varios motivos estructurales comunes permiten que los factores de transcripción reguladores se unan al DNA y activen la transcripción

Aunque no todos los factores de transcripción se unen directamente a DNA, aquellos que lo hacen tienen un papel crítico en el control de la transcripción. Las proteínas de esta categoría incluyen el factor de transcripción general, TFIID y, lo que es más importante, la gran variedad de factores de transcripción reguladores (activadores y represores) que reconocen y se unen a las secuencias de DNA específicas que se encuentran en los elementos proximales de control, los potenciadores y los silenciadores. ¿Cuáles de las características de estos factores de regulación les permiten llevar a cabo sus funciones?

Los factores de transcripción reguladores tienen dos actividades distintivas, la capacidad de unirse a una secuencia de DNA específica y la capacidad de regular la

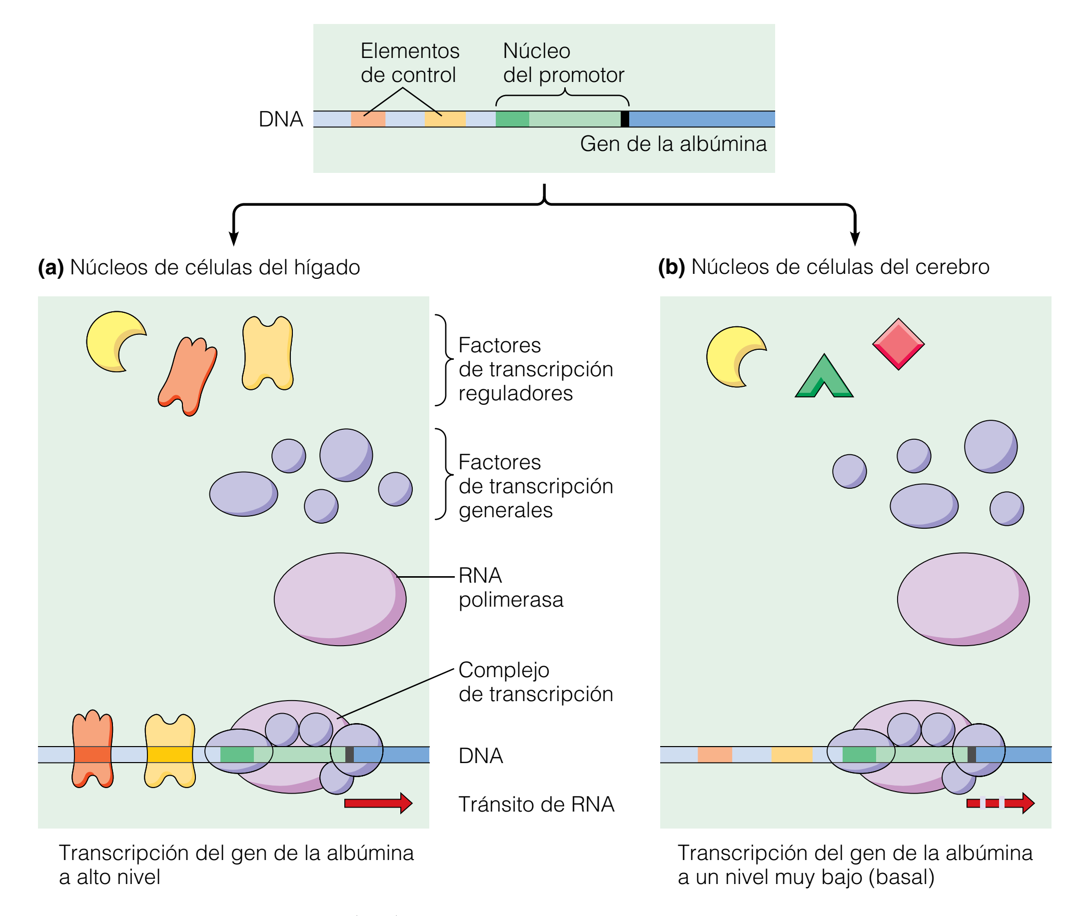


Figura 23.24 Modelo combinatorial para la expresión génica. El gen de la proteína albúmina, como otros genes, se asocia con una cadena de elementos reguladores del DNA; aquí se muestran sólo dos elementos de control, así como el núcleo del promotor. Las células de todos los tejidos contienen la RNA polimerasa, y los factores generales de transcripción, pero el conjunto de factores reguladores de transcripción (factores especiales) disponible varía con el tipo celular. Como se muestra aquí, (**a**) las células del hígado contienen un conjunto distinto de factores reguladores de transcripción que incluye los factores para reconocer todos los elementos de control del gen de la albúmina. Cuando estos factores se unen al DNA, facilitan la transcripción del gen de la albúmina a altos niveles. (**b**) Las células del cerebro, sin embargo, tienen un conjunto distinto de factores reguladores de transcripción, que no incluye a todos los del gen de la albúmina. En consecuencia, en las células del cerebro, el complejo de transcripción puede ensamblarse al promotor, pero no con mucha eficiencia. El resultado es que las células del cerebro sólo transcriben el gen de la albúmina con una tasa baja.

transcripción. Las dos actividades se encuentran en dominios proteicos separados. El dominio que reconoce y se une a una secuencia de DNA específica se denomina **dominio de unión al DNA**, mientras que la región de la proteína requerida para la regulación de la transcripción se conoce como **dominio de regulación de la transcripción** (o **dominio de activación**, porque la mayoría de los factores de transcripción activan, más que inhiben, la transcripción). La existencia de dominios separados de unión al DNA y de activación se ha demostrado mediante experimentos de «intercambio de dominios» en los que la región de unión al DNA de un factor de transcripción, se combina con varias regiones de un segundo factor de transcripción. La molécula híbrida resultante puede activar el gen de la transcripción sólo si contiene un dominio de activación proporcionado por el segundo factor de transcripción.

Los estudios de este tipo han revelado que los dominios de activación suelen tener una alta proporción de aminoácidos ácidos, lo que produce una enorme carga negativa que generalmente se concentra en un lado de la hélice α. Las mutaciones que incrementan el número de cargas negativas tienden a incrementar la capacidad de la proteína para activar la transcripción, mientras que las mutaciones que disminuyen la carga neta negativa o distorsionan la concentración en un lado de la hélice α, disminuyen la capacidad de activar la transcripción. Además de los dominios ácidos, se han identificado algunos otros tipos de dominios de activación en los factores de transcripción. Algunos están enriquecidos en el aminoácido glutamina y otros contienen grandes cantidades de prolina. Así, parece que hay varios tipos distintos de estructuras proteicas que son capaces de generar un dominio de activación que puede estimular la transcripción génica.

También se han encontrado varios tipos de estructuras en los dominios de unión al DNA de los factores de transcripción. De hecho, la mayoría de los factores de transcrip-

ción reguladores se pueden situar en uno de los pequeños grupos de categorías basadas en el patrón de estructura secundaria, o motivo, que forma el dominio de unión al DNA. Describiremos ahora brevemente varios de los motivos de unión al DNA más comunes.

Motivo hélice-vuelta-hélice. Uno de los dominios de unión al DNA más comunes, detectado tanto en factores de regulación de la transcripción de eucariotas como de procariotas, es el **hélice-vuelta-hélice** (Figura 23.25a). Este motivo consta de dos hélices α separadas por un doblez en la cadena polipeptídica. Aunque la secuencia de aminoácidos del motivo difiere entre distintas proteínas de unión a DNA, el patrón general es siempre el mismo: una α hélice, denominada *hélice de reconocimiento*, contiene las cadenas laterales de los aminoácidos que reconocen y se unen a secuencias de DNA específicas para formar puentes de hidrógeno con las bases localizadas en el surco mayor de la doble hélice de DNA, mientras que la segunda hélice α estabiliza la configuración general mediante interacciones hidrofóbicas con la hélice de reconocimiento. Los represores *lac* y *trp*, la proteína CRP y muchas proteínas represoras de fagos son ejemplos de proteínas procariotas que presentan un motivo hélice-vuelta-hélice, y los factores de transcripción que regulan el desarrollo embrionario (el tipo de factores codificados por genes homeóticos, que se describirán más tarde) son ejemplos en eucariotas. La Figura 23.25b es un modelo del represor del fago λ, una proteína hélice-vuelta-hélice, unida a DNA. Como muchas proteínas reguladoras de unión a DNA, el represor del fago λ consta de dos polipéptidos idénticos, cada uno con un dominio de unión a DNA.

Motivo dedos de zinc. Identificados inicialmente en un factor de transcripción de los genes para el RNAr 5S (TFIIIA), el motivo de unión al DNA **dedos de zinc**, consta de una hélice α y una lámina β de dos segmentos, sostenidos por la interacción de determinados residuos de cisteína con un átomo de zinc. El número de dedos de zinc presentes por molécula de proteína varía entre los distintos factores de transcripción en los que se encuentran, pudiendo oscilar entre dos y varias docenas o más. La Figura 23.25c muestra una proteína con cuatro dedos de zinc alineados (TFIIIA tiene nueve). Los dedos de zinc salen de la superficie de la proteína y sirven como puntos de contacto con secuencias de bases específicas del surco mayor del DNA.

Motivo cremallera de leucina. El motivo **cremallera de leucina** está formado por la interacción entre dos cadenas polipeptídicas, cada una con una hélice α con residuos de leucina espaciados regularmente. Dado que las leucinas son aminoácidos hidrófobos que se atraen entre sí, el conjunto de leucinas expuestas en la superficie externa de la hélice α puede entrelazarse con un conjunto comparable de leucinas de otra hélice α, haciendo que las dos hélices se envuelvan entre sí, formando un enrollamiento que hace que las dos hélices formen una «cremallera» (Figura 23.25d). En algunos factores de transcripción, las cremalleras de leucina se usan para unir de esta forma dos polipéptidos idénticos; en otros factores de transcripción, se unen dos tipos de polipéptidos. En cada caso, la unión al DNA se hace posible por dos regiones en hélice α adicionales, localizadas junto a la cremallera de leucina.

Motivo hélice-vuelta-hélice. El motivo **hélice-vuelta-hélice** está compuesto por una hélice α corta, conectada por un bucle a otra hélice α más larga (Figura 23.25e). Como las cremalleras de leucina, los motivos hélice-vuelta-hélice contienen regiones hidrófobas, que normalmente conectan dos polipéptidos, que pueden ser similares o distintos. La formación del haz de cuatro hélices tiene como resultado la yuxtaposición de una hélice de reconocimiento derivada de un polipéptido con una hélice de reconocimiento derivada de otro polipéptido, generando un dominio de unión al DNA de dos partes.

Los elementos de respuesta del DNA coordinan la expresión de genes no adyacentes

Hasta ahora nos hemos centrado en la forma de regulación de los factores de transcripción de genes individuales. Pero las células eucariotas, como las procariotas, suelen necesitar activar un conjunto de genes relacionados al mismo tiempo. En los eucariotas unicelulares, como en las bacterias, esta regulación génica coordinada puede ser necesaria para responder a algunas señales del ambiente externo. En los eucariotas multicelulares, la regulación génica coordinada es crítica para el desarrollo y funcionamiento de tejidos especializados. Por ejemplo, durante el desarrollo embrionario, un huevo fecundado de un animal puede generar trillones de células nuevas de cientos de tipos distintos, cada una de ellas transcribiendo un grupo distinto de genes —células nerviosas expresando los genes requeridos para la función nerviosa, células musculares expresando los genes requeridos para la función muscular, etc.—. ¿Cómo coordinan los eucariotas la expresión de grupos de genes relacionados en estas condiciones?

A diferencia de lo que sucede en procariotas, donde los genes con funciones relacionadas suelen encontrarse cerca los unos de los otros en operones, los genes eucariotas que se deben activar (o desactivar) al mismo tiempo, se encuentran normalmente dispersos por todo el genoma. Para coordinar la expresión de estos genes, físicamente separados, los eucariotas emplean secuencias de control del DNA, denominadas **elementos de respuesta** con el fin de activar o desactivar la transcripcion *en respuesta a* una determinada señal ambiental o comportamental. Los elementos de respuesta pueden funcionar como elementos proximales de control o como componentes de los potenciadores. En cada caso, la colocación del mismo tipo de ele-

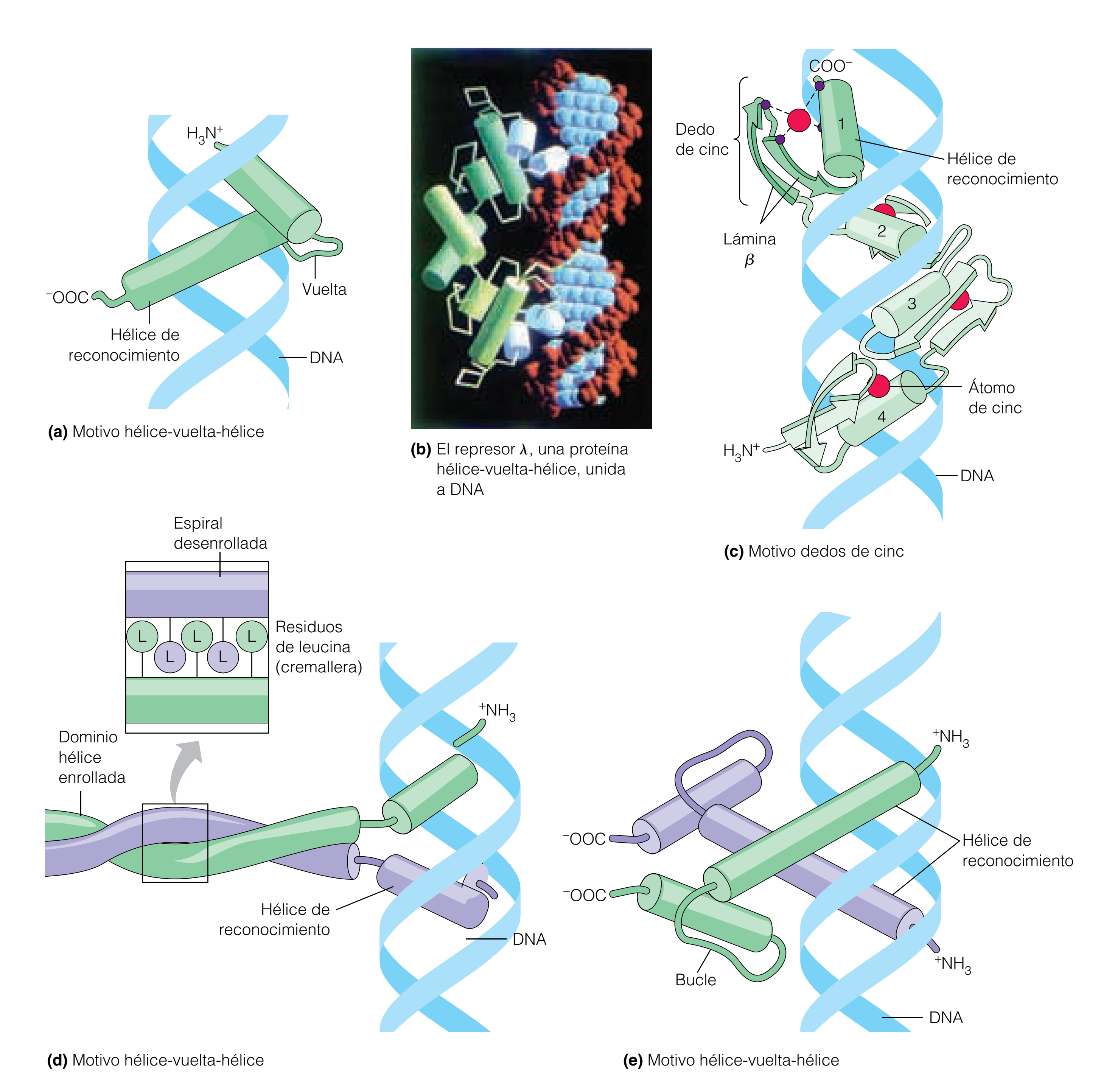


Figura 23.25 Motivos estructurales frecuentes de unión al DNA, en los factores de transcripción. En los dominios de unión al DNA de los factores de transcripción reguladores se encuentran varios motivos estructurales. Las partes de estos dominios que interaccionan directamente con secuencias específicas del DNA, suelen ser hélices α, denominadas hélices de reconocimiento, que se sitúan en el surco mayor del DNA. En esta figura, todas las hélices α se muestran como cilindros. (**a**) Motivo hélice-vuelta-hélice, en el que dos hélices se unen por una pequeña vuelta flexible. (**b**) Modelo gráfico por ordenador mostrando al represor λ, una proteína hélice-vuelta-hélice, unida a DNA. Es un dímero formado por dos subunidades distintas. Las hélices de los dos dominios de unión al DNA están coloreadas en azul claro. (**c**) Motivo de dedos de zinc. Cada dedo de zinc consta de una hélice α y una lámina β antiparalela de dos segmentos (mostrada como cintas), unidas por la interacción de cuatro residuos de cisteína, o dos cisteínas y dos histidinas, con un átomo de zinc. En la parte superior del diagrama, estos residuos clave se muestran como pequeñas bolas púrpura; los átomos de zinc se muestran como bolas rojas más grandes. Las proteínas de dedos de zinc típicas, presentan varios dedos de zinc en fila; aquí vemos cuatro. (**d**) Motivo cremallera de leucina, en el que una hélice α con residuos de leucina dispuestos regularmente en un polipéptido (verde), interaccionan con una región similar de un segundo polipéptido (púrpura). Las dos hélices se enrollan entre sí. (**e**) Motivo hélice-bucle-hélice, el que una hélice α corta, conectada por un bucle polipeptídico a una hélice α más larga, interacciona con una región similar de otro polipéptido, para generar un dímero.

mento de respuesta junto a los genes que se encuentran en distintas localizaciones cromosómicas permite que estos genes se controlen juntos, incluso no estando localizados todavía cerca los unos de los otros.

Dado que permiten la regulación controlada y coordinada de conjuntos de genes, los elementos de respuesta tienen un papel fundamental en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo embrionario y durante las respuestas de los tejidos a los cambios de las condiciones fisiológicas y ambientales. En las siguientes secciones, describiremos varios ejemplos de esta regulación génica coordinada.

Los receptores de hormonas esteroídicas son factores de transcripción que se unen a elementos de respuesta hormonal

Un importante grupo de factores de transcripcion implicados en la regulación génica coordinada, está compuesto por los **receptores nucleares**, que median la acción de hormonas esteroídicas como la progesterona, los estrógenos, la testosterona y los glucocorticoides. Las hormonas esteroídicas son moléculas de señalización lipídicas, sintetizadas por células de los tejidos endocrinos. Las hormonas se liberan a la sangre, donde sirven como mensajeros químicos que transmiten señales a los tejidos diana cuyas células poseen la proteína receptora adecuada. Una vez que ha entrado en una célula diana, la hormona esteroídica se une a su receptor correspondiente, desencadenando una serie de acontecimientos que, en último caso activan, o en algunos casos inhiben, la transcripción de un conjunto de específico genes. (Los receptores intracelulares de la hormona tiroidea, vitamina D y ácido retinoico funcionan de forma similar.)

La clave de este efecto selectivo de la expresión génica se encuentra en la capacidad de los receptores de las hormonas esteroídicas para funcionar como factores de transcripción que se unen a secuencias de control del DNA denominadas **elementos de respuesta a hormonas**. Todos los genes cuya transcripción está activada por una hormona esteroídica concreta, están asociados con el mismo tipo de elemento de respuesta, permitiendo que se puedan regular de forma conjunta. Por ejemplo, los genes activados por estrógenos tienen un *elemento de respuesta a estrógenos* de 15 pb cerca del extremo más distal de su promotor, mientras que los genes activados por glucocorticoides son adyacentes al *elemento de respuesta a glucocorticoides*, que presenta una secuencia de bases ligeramente distinta (Figura 23.26).

¿Cómo activan los receptores de hormonas esteroídicas la transcripción de los genes asociados con el elemento de respuesta adecuado? Los receptores de hormonas esteroídicas pertenecen a la categoría de los factores de transcripción de dedos de zinc. Normalmente contienen tres dominios distintos: un dominio que se une a una hormona concreta, un dominio que se une al elemento de respuesta adecuado y un dominio que activa la transcripción. Tomando como ejemplo la hormona glucocorticoide *cortisol,* la Figura 23.27 ilustra cómo la unión de una hormona esteroídica a su receptor, puede desencadenar un cambio en la expresión génica. En ausencia de cortisol, el receptor de glucocorticoides (GR) se localiza fundamentalmente en el citosol, donde está unido a proteínas que son miembros de la familia *Hsp* de chaperonas moleculares. Tan pronto como se asocia a estas proteínas Hsp, la molécula GR ya no entra en el núcleo y no puede, por lo tanto, unirse a DNA. Pero la unión de cortisol a GR cambia su conformación, haciendo que se libere de las proteínas Hsp. La molécula GR (con el cortisol unido) puede entonces desplazarse al núcleo, donde se une a los elementos de respuesta a glucocorticoides que se encuentren en cualquier lugar del DNA. La unión de la molécula de GR a estos elementos de respuesta facilita a su vez la unión de una segunda molécula GR al mismo elemento de respuesta. El *dímero* GR resultante activa la transcripción de los genes adyacentes mediante el reclutamiento de coactivadores que promueven el ensamblaje de la maquinaria transcripcional.

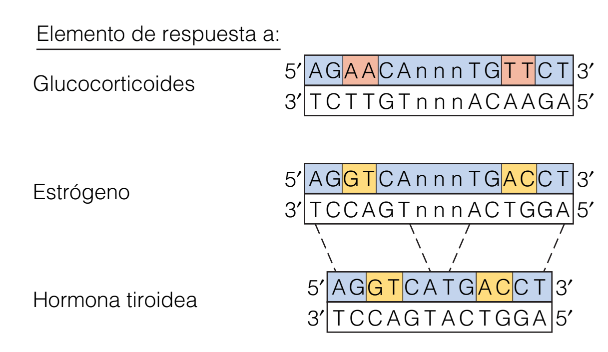


Figura 23.26 Comparación de las secuencias de DNA de varios elementos de respuesta a hormonas. Observe que las tres secuencias de DNA contienen repeticiones invertidas (dos copias de la misma secuencia orientadas en direcciones opuestas). Por ejemplo, leyendo la secuencia del elemento de respuesta a glucocorticoides en la dirección 5′ → 3′de cada hebra, se obtiene la misma secuencia: 5′-AGAACA. Los nucleótidos resaltados son las únicas bases de las secuencias repetidas que varían entre los tres tipos de elementos. El elemento de la hormona tiroidea contiene las mismas secuencias invertidas repetidas que las del elemento del estrógeno, pero las tres bases que separan las dos copias en la secuencia del elemento del estrógeno no están presentes. (La «n» significa que cualquier nucleótido puede estar colocado en esa posición. Se han añadido líneas discontinuas para ayudar a alinear las regiones comparables de los elementos de control de la hormona tiroidea y del estrógeno).

Puede darse esta unión de dos moléculas de GR al mismo sitio del DNA por el hecho de que la secuencia de DNA del elemento de respuesta a glucocorticoides contiene una **repetición invertida**, es decir, dos copias de la misma secuencia de DNA orientadas en direcciones opuestas (*véase* Figura 23.26). Así, cada una de las dos moléculas de GR del

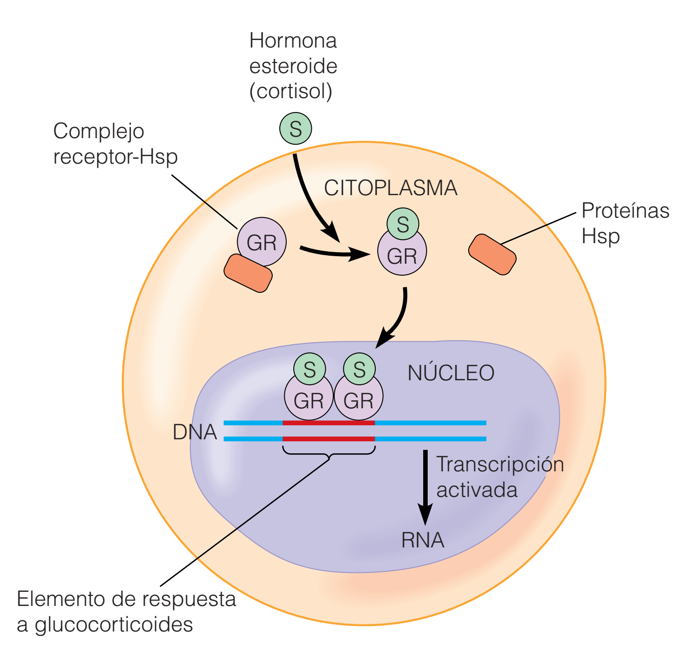


Figura 23.27 Activación de la transcripción génica por receptores de glucocorticoides. La hormona esteroídica cortisol (S) difunde a través de la membrana plasmática y se une al receptor de glucocorticoides (GR), provocando la liberación de las proteínas Hsp y activando el sitio de unión al DNA de la molécula GR. La molécula GR entra entonces en el núcleo y se une al elemento de respuesta a glucocorticoides del DNA, que a su vez hace que se una al mismo elemento de respuesta una segunda molécula de GR. El dímero GR resultante activa la transcripción del gen adyacente.

dímero GR se une a una de las repeticiones de la secuencia de DNA. Esta unión de una proteína dimérica a una repetición invertida es una característica común en los factores de transcripción reguladores.

Ya que los elementos de respuesta a glucocorticoides están localizados cerca de todos los genes que deben ser activados por cortisol, la presencia de cortisol activará todos estos genes simultáneamente, independientemente de su localización cromosómica. Este modelo es una base para comprender cómo las hormonas esteroídicas, transportadas a través de la sangre a todas las células del organismo, pueden activar un conjunto de genes específico en los tejidos diana adecuados. Sin embargo, se han observado algunas diferencias mínimas en varias hormonas esteroídicas. Por ejemplo, a diferencia de los receptores de glucocorticoides, los receptores de la mayoría de las hormonas esteroídicas ya están localizados en el núcleo, incluso en ausencia de hormona. Pero en estas circunstancias, los receptores nucleares no activan la transcripción porque, como el receptor de glucocorticoides, están unidos a proteínas inhibidoras. En este caso también, la unión de la hormona esteroídica adecuada libera al receptor de su asociación con la proteína inhibidora (o proteínas), permitiendo al receptor unirse a su elemento de respuesta y activar la transcripción.

Aunque los receptores de hormonas esteroídicas normalmente estimulan la transcripción, en algunos casos la inhiben. Por ejemplo, el receptor de glucocorticoides se puede unir dos tipos distintos de elementos de respuesta —un tipo asociado con los genes cuya transcripción se activa y el otro con los genes cuya transcripción se inhibe—. Después de unirse al elemento de respuesta de tipo inhibidor, el receptor de glucocorticoides no forma dímeros como lo hace al unirse a elementos de respuesta activadores. En lugar de esto, el receptor no dimérico disminuye el nivel de iniciación de la transcripción reclutando una enzima que elimina grupos acetilo de las histonas, promoviendo así la condensación de la cromatina e interfiriendo en la unión de la maquinaria transcripcional a la región promotora. La existencia de distintos elementos de respuesta activadores e inhibidores para el mismo receptor hormonal permite que una misma hormona estimule la transcripción de genes que codifican un grupo de proteínas mientras simultáneamente reprime la transcripción de genes que codifican otras proteínas.

CREBs y STATs son ejemplos de factores de transcripción activados por fosforilación

Los receptores de hormonas esteroídicas que hemos visto son proteínas alostéricas que regulan la expresión génica cambiando su afinidad de unión al DNA en respuesta a hormonas esteroídicas, de forma muy similar a la que los represores bacterianos cambian sus propiedades de unión al DNA, tras la unión de las moléculas adecuadas. Una aproximación alternativa para controlar la actividad de los factores de transcripción se basa en la *fosforilación de las proteínas* (adición de grupos fosfato). Un ejemplo bastante común es el control que implica a *cAMP* (*AMP cíclico*), un segundo mensajero muy común, cuyo papel como mediador de los efectos de una gran variedad de moléculas extracelulares de señalización, ya vimos en el Capítulo 14. Como vimos anteriormente en este capítulo, también interviene en el control de los operones reprimibles por catabolito en las bacterias. En los eucariotas, el cAMP estimula la actividad de la proteín quinasa A, que a su vez cataliza la fosforilación de varias proteínas, entre las que se incluye un factor de transcripcion denominado **CREB** (Figura 23.28). La proteína CREB se une normalmente a secuencias de DNA denominadas *elementos de respuesta a cAMP (CRE),* que están localizadas junto a los genes cuya transcripción es inducida por cAMP. Una vez fosforilada, la proteína CREB recluta a un coactivador transcripcional denominado **CBP** («CREB binding protein», proteína de unión a CREB). CBP cataliza entonces la acetilación de histonas, que desempaquetan los nucleosomas e interaccionan con la RNA polimerasa, para facilitar el ensamblaje de la maquinaria de transcripción en las proximidades de los promotores.

La fosforilación de las proteínas también está implicada en la activación de una familia de factores de transcrip-

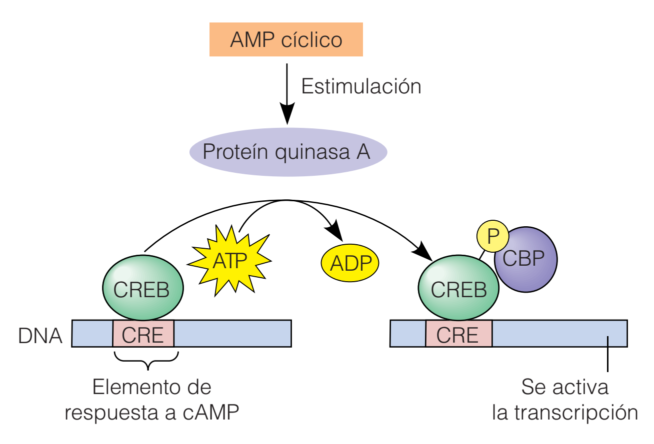


Figura 23.28 Activación de la transcripción génica por AMP cíclico. Los genes activados por AMP cíclico tienen un elemento de respuesta a cAMP (CRE) que une un factor de transcripción denominado CREB. En presencia de AMP cíclico, la proteín quinasa A citoplásmica está activada y su subunidad catalítica se trasloca entonces hacia el núcleo, donde cataliza la fosforilación de CREB. CREB fosforilada se une a su vez a CBP, un coactivador transcripcional que tiene actividad acetiltransferasa de histonas. Además de catalizar la acetilación de histonas, que causa el desempaquetamiento de los nucleosomas, CBP se asocia también a la RNA polimerasa y facilita el ensamblaje de la maquinaria de transcripción en los promotores.

ción denominada **STATs** (acrónimo de «**S**ignal **T**ransducers and **A**ctivators of **T**ranscription», Transductores de la Señal y Activadores de la Transcripción). Entre las moléculas que activan STATs se encuentran los *interferones*, un grupo de glicoproteínas producidas y secretadas por células animales en respuesta a una infección viral. Los interferones secretados se unen a receptores de la superficie de las células vecinas, haciendo que produzcan proteínas que hacen más resistentes a la infección a las células diana del virus. La unión del interferón a sus receptores de superficie hace que el dominio citosólico del receptor se asocie con una proteín quinasa denominada **quinasa activada Janus (Jak).** La proteína Jak activada cataliza a su vez la fosforilación de moléculas STAT, que normalmente se encuentran presentes en forma inactiva en el citoplasma. La fosforilación hace que las moléculas STAT dimericen y se desplacen al núcleo, donde se unen a los elementos de respuesta del DNA adecuados, activando la transcripción.

La ruta de señalización Jak-STAT presenta una especificidad considerable. Por ejemplo, hay varios tipos de interferón que desencadenan la fosforilación y activación de distintas proteínas STAT, cada una de las cuales se asocia con un tipo concreto de elemento de respuesta del DNA y por lo tanto activa la transcripción de un conjunto único de genes. Además de los interferones, existen otros tipos de señales moleculares que se unen a los receptores de superficie que promueven la fosforilación de STATs.

Los STATs y la proteína CREB son sólo dos de los muchos tipos de factores de transcripción que se sabe que son activados por fosforilación. En el Capítulo 14, por ejemplo, vimos que la familia TGF*b* de factores de crecimiento, se unen a receptores de la membrana plasmática, cuya activación produce la fosforilacion de proteínas citoplasmáticas denominadas *Smads*, que después se desplazan al núcleo y funcionan como factores de transcripción. En el Capítulo 19 vimos también cómo otros factores de crecimiento desencadenan la activación de proteín quinasas denominadas *MAP quinasas*, que fosforilan y activan factores de transcripción implicados en el control del crecimiento y división celular.

El elemento de respuesta a choque térmico coordina la expresión de genes activados por altas temperaturas

Los **genes heat-shock** (de choque térmico) son otro ejemplo de cómo los eucariotas coordinan la regulación de los genes localizados en cromosomas distintos. Los genes de choque térmico se definieron inicialmente como genes que se expresaban en respuesta a un incremento de temperatura. Hoy se sabe que responden también a otras condiciones de estrés, de manera que ahora son llamados también *genes de respuesta a estrés.* Hay distintos genes de choque térmico tanto en genomas eucariotas como en procariotas, y las condiciones ambientales adecuadas los activan simultáneamente. Por ejemplo, el breve calentamiento de las células en cultivo por un aumento de algunos grados en la temperatura, activa la transcripción de muchos genes de choque térmico. Aunque no se conocen bien las funciones de estos genes, las proteínas producidas por algunos de ellos ayudan a minimizar el daño provocado por la desnaturalización térmica de proteínas celulares importantes.

En células de *Drosophila*, por ejemplo, el producto mayoritario de los genes de choque térmico es Hsp70, una chaperona molecular implicada en el plegamiento de las proteínas que también puede facilitar el replegamiento de proteínas desnaturalizadas por calor. La región inmediatamente delante del sitio de iniciación del gen *hsp70*, contiene varias secuencias que se encuentran frecuentemente en promotores de eucariotas, como una caja TATA, una caja CAAT y una caja GC. Además, una secuencia de 14 pb denominada **elemento de respuesta a choque térmico,** está localizada 62 bases delante del sitio de iniciación de la transcripción del *gen hsp70 de Drosophila*, y en una localización comparable en otros genes cuya transcripción está activada por temperaturas elevadas.

Para estudiar el papel de esta secuencia en la regulación de la trancripción, Hugh Pelham empleó técnicas de DNA recombinante, para transferir el elemento de respuesta a choque térmico del gen *hsp70* a una posición adyacente de un gen viral, que codifica la enzima timidina quinasa. La transcripción del gen de la timidina quinasa no está inducida normalmente por calor, pero cuando el gen híbrido se introduce en las células, un incremento en la temperatura desencadena la expresión de la timidina quinasa. En otras palabras, la presencia del elemento de res-

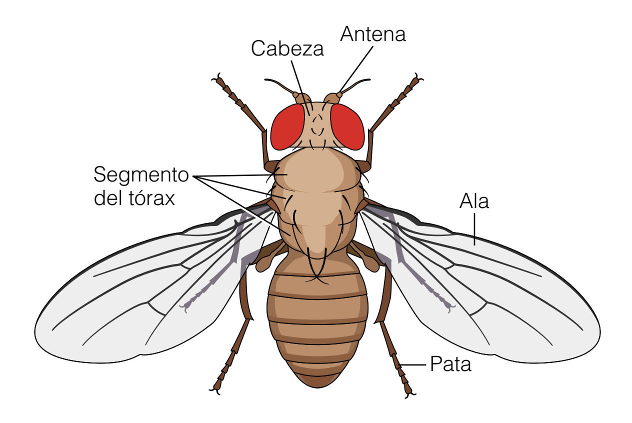
puesta a choque térmico hizo que el gen de la timidina quinasa se activara por calor como un gen típico de choque térmico. Las investigaciones posteriores han revelado que la activación de los genes de choque térmico está mediada por la unión, al elemento de respuesta a choque térmico, de una proteína denominada *factor de transcripción de choque térmico*. El factor de transcripción de choque térmico está presente de forma inactiva en células no sometidas a un calentamiento, pero las temperaturas elevadas provocan un cambio en la estructura de la proteína que le permite unirse al elemento de respuesta a choque térmico del DNA. La proteína es modificada más tarde por fosforilación, de manera que puede así activar la transcripción.

El sistema de choque térmico ilustra de nuevo un principio básico de la regulación coordinada en eucariotas: los genes localizados en distintos lugares del cromosoma pueden ser activados por la misma señal si cerca de ellos se localiza el mismo elemento de respuesta.

Los genes homeóticos codifican factores de transcripción que regulan el desarrollo embrionario

Algunos ejemplos especialmente interesantes de regulación génica en eucariotas implican a un conjunto de genes atípico denominados **genes homeóticos**. Cuando aparecen mutaciones en uno de estos genes, sucede algo extraño durante el desarrollo embrionario —una parte del cuerpo es sustituida por una estructura que normalmente aparece en otro lugar—. El descubrimiento de los genes homeóticos se remonta a los años 40, cuando Edward B. Lewis descubrió un conjunto de genes en *Drosophila*, el *complejo bithorax*, en el que ciertas mutaciones causan drásticas anomalías en el desarrollo, como el crecimiento de un par de alas extra (Figura 23.29b). Más tarde, Thomas C. Kaufman y sus colaboradores descubrieron un segundo conjunto de genes que, cuando se mutaban, generaban cambios diferentes, pero igualmente drásticos, en el desarrollo —por ejemplo, haciendo que las patas crecieran en la cabeza en el lugar de las antenas (Figura 23.29c). Este grupo de genes es el *complejo antenapedia*. Los genes bithorax y antenapedia se denominan genes homeóticos porque *homeo* significa «parecido» en griego, y las mutaciones de estos genes cambian un segmento del cuerpo de *Drosophila* que se parece a otro.

Aunque este fenómeno puede, en principio, parecer una rareza de la naturaleza, el crecimiento de una par alas extra o el desarrollo de patas en el lugar incorrecto sugiere que los genes homeóticos tienen un papel fundamental en el control de la formación del plan de desarrollo embrionario. Los genes homeóticos ejercen su influencia en el desarrollo embrionario, porque codifican una familia de factores de transcripción reguladores que activan (o inhiben) la transcripción de genes importantes para la unión a secuencias específicas del DNA. Uniéndose a todas las copias del elemento adecuado del DNA en el genoma, cada factor de transcripción homeótico puede ejercer una in-



(a) *Drosophila* no mutada



(b) Mutante bithorax



(c) Mutante antenapedia

Figura 23.29 Mutantes homeóticos de *Drosophila*. (**a**) *Drosophila* en estado nativo tiene dos alas y seis patas que se extienden desde sus tres segmentos torácicos. (**b**) Las mutaciones en el gen bithorax convierten el tercer segmento torácico en un segundo segmento torácico (el segmento que produce las alas) y se forma un conjunto adicional de alas. (**c**) Una mutación en el complejo de genes antenapedia hace que las patas se desarrollen donde deberían estar las antenas.

fluencia en la expresión de docenas o incluso cientos de genes en el embrión en desarrollo. El resultado de esta regulación génica coordinada es el desarrollo de características fundamentales del cuerpo del organismo, como la forma y la localización de un apéndice. La mayor parte de los genes homeóticos controlan las principales rutas del desarrollo y en vertebrados también pueden ayudar a regular otros procesos importantes, como la producción de histonas y la síntesis de anticuerpos.

La clave para saber cómo funcionan los genes homeóticos surgió del descubrimiento de que los genes bithorax y antenapedia contienen una secuencia similar de 180 pb cerca de su extremo 3′, que se parece a una secuencia comparable de otros genes homeóticos. Denominada **homeobox,** esta secuencia del DNA codifica una cadena de 60 aminoácidos llamada **homeodominio** (Figura 23.30). Se han detectado secuencias homeobox en más de 60 genes de *Drosophila* y en una variedad de organismos tan diversa como ascidias, ranas, ratones y hombres —una distancia evolutiva de más de 500 millones de años—. De hecho, la porción C-terminal del homeodominio eucariota típico presenta incluso alguna homología con represores procariotas.

La amplia presencia de homeobox sugiere que el homeodominio que codifica debe tener una función importante, por lo que ha sido altamente conservado durante la evolución.

Como el represor *lac* bacteriano, el represor *trp* y los receptores de cAMP que vimos al principio del capítulo, el homeodominio contiene un motivo hélice-vuelta-hélice, lo que sugiere que se une al DNA. Esta hipótesis ha sido confirmada sintetizando la región del homeodomino del factor de transcripción codificado por el gen antenapedia y viendo que este segmento de 60 aminoácidos se une a DNA en una secuencia específica, de la misma manera que el factor de transcripción intacto.

Se ha estudiado el papel del homeodominio hélice-vuelta-hélice en la unión al DNA en un gen homeótico denominado *bicoide*, que es necesario para el establecimiento de la adecuada polaridad antero-posterior durante el desarrollo de *Drosophila*. El aminoácido lisina está presente en la posición número 9 de la hélice de reconocimiento del motivo hélice-vuelta-hélice en la proteína bicoide, mientras la glutamina está presente en la posición comparable de la proteína antenapedia. Normalmente, las proteínas bicoide y antenapedia funcionan como factores de transcripción que se unen a diferentes elementos de respuesta del DNA. Sin embargo, si la lisina presente en la posición 9 de la proteína bicoide está cambiada por glutamina, la proteína bicoide alterada se une a secuencias de DNA reconocidas normalmente por la proteína antenapedia. Así, el motivo hélice-vuelta-hélice del homeodominio no sólo media la unión al DNA, sino que además bastan pequeñas diferencias en aminoácidos dentro de este motivo para que la proteína se una a regiones diferentes del DNA.

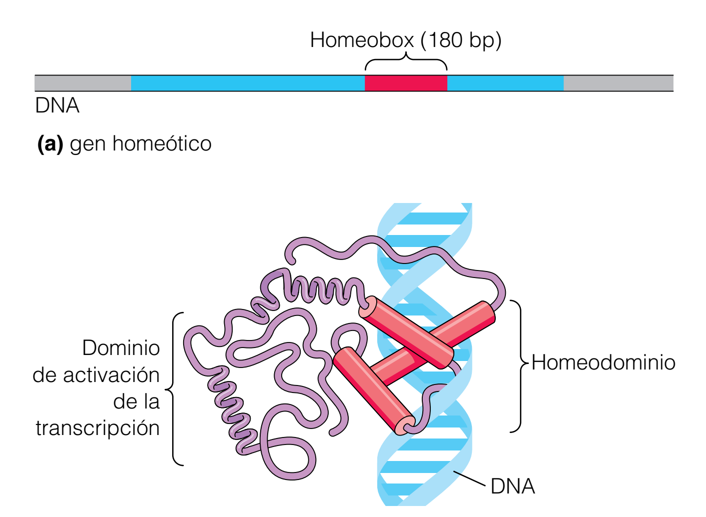


Figura 23.30 Genes homeóticos y proteínas. (**a**) Los mutantes homeóticos como los que se muestran en la Figura 23.29 tienen mutaciones en los genes homeóticos. Todos estos genes contienen un segmento de 180 pb, denominado homeobox, que codifica un homeodominio en la proteína homeótica. (**b**) El homeodominio (rojo) es un dominio de unión a DNA, de tipo hélice-vuelta-hélice, que en combinación con el dominio de activación de la transcripción, permite a la proteína funcionar como un factor de regulación de la transcripción. Observe que el homeodominio tiene tres hélices α (representadas como cilindros).

Regulación de la transcripción en eucariotas: control postranscripción

Ya hemos visto los dos primeros niveles de regulación de la expresión de los genes en eucariotas, fundamentalmente controles genómicos y transcripcionales. Una vez que la transcripción ha tenido lugar, el flujo de información genética implica una compleja serie de *eventos postranscripcionales*, que pueden ser puntos de regulación (*véase* Figura 23.11, pasos ③, ④ y ⑤). La regulación postranscripcional puede ser especialmente útil para ajustar rápidamente el patrón de expresión, permitiendo a las células responder a cambios transitorios en el ambiente intracelular o extracelular, sin modificar todos sus patrones de transcripción.

Tras la transcripción se dan los procesos de control del procesamiento de RNA y la exportación nuclear

El control postranscripcional empieza con el procesamiento de los tránscritos primarios de RNA, que ofrece muchas oportunidades para la regulación de la expresión génica. Como vimos en el Capítulo 21, potencialmente todos los tránscritos de RNA de los núcleos eucariotas experimentan un procesamiento sustancial, que incluye la adición de un casquete en 5′ y una cola de poli(A) en 3′, modificaciones químicas como la metilación, el corte y empalme

(splicing o ayuste) de exones y la eliminación de intrones y la edición del RNA. Entre estos tipos de procesamiento, el ayuste es un tipo de control especialmente importante, porque su regulación permite a las células crear varios mRNAs a partir del mismo pre-mRNA, permitiendo así que un gen genere más de un producto.

Este fenómeno, denominado **ayuste alternativo del RNA**, está controlado por proteínas que se unen a las moléculas de pre-mRNA, haciendo que se ignoren algunos sitios de ayuste y que otros se activen. Incrementando las formas de ayuste de un determinado pre-mRNA, estos mecanismos hacen posible que un solo gen pueda dar lugar a docenas o incluso cientos de mRNAs diferentes. En el oído interno de las aves se ha descubierto un ejemplo destacable, donde se producen 576 formas de mRNA por ayuste alternativo, a partir de un solo gen que codifica un canal de potasio. La expresión de varios subconjuntos de estos mRNAs en las diferentes células del oído interno facilita la percepción de diferentes frecuencias de sonido.

La Figura 23.31 muestra otro ejemplo bien documentado de ayuste alternativo del RNA, que en este caso afecta al mRNA que codifica un tipo de anticuerpo denominado *inmunoglobulina M (IgM)*. La proteína IgM existe en dos versiones, una que se secreta y otra que se incorpora a la membrana plasmática de la células que la sintetizan. Como todos los anticuerpos, la IgM consta de cuatro subunidades polipeptídicas, dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. La secuencia de la cadena pesada es la que determina si la IgM se secreta o se queda unida a la membrana.

El gen que codifica la cadena pesada tiene dos sitios poli(A) alternativos, donde pueden terminar los tránscritos, dando lugar a dos tipos de moléculas de pre-mRNA que difieren en sus extremos 3′. Los exones de estos pre-mRNA se empalman de dos formas distintas, produciendo mRNAs que codifican la versión de secreción de la cadena pesada o la forma de unión a la membrana plasmática. Sólo el patrón de ayuste de la versión que se une a la membrana incluye los exones que codifican los aminoácidos hidrófobos que anclan la cadena pesada a la membrana plasmática.

Tras el ayuste, el siguiente paso postranscripcional sujeto a control es la exportación del mRNA a través de los poros nucleares hacia el citoplasma. Sabemos que este proceso de exportación está controlado porque los RNAs que presentan defectos en la adición del casquete o en el ayuste, tienen una baja tasa de exportación desde el núcleo. La

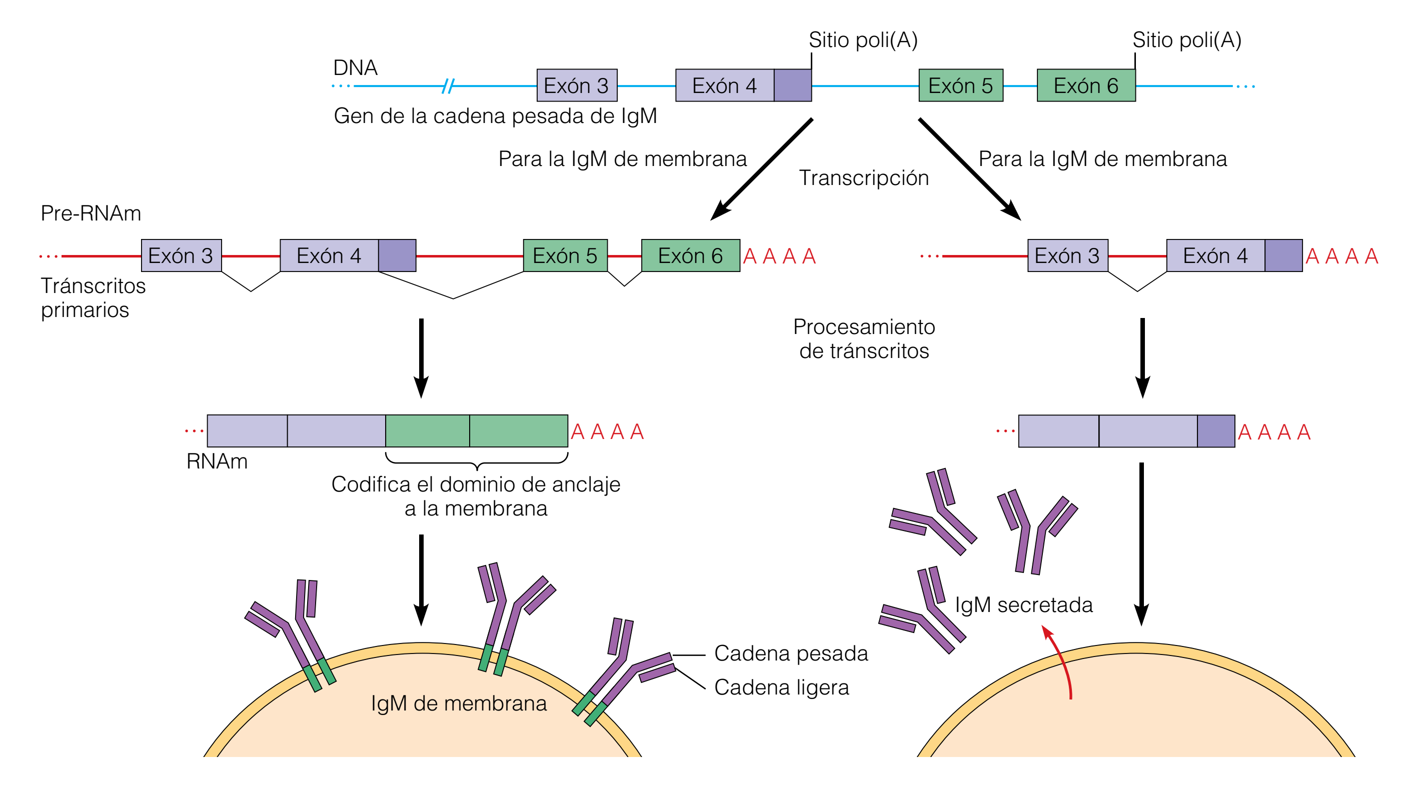


Figura 23.31 El ayuste alternativo de RNA da lugar distintos productos de un mismo gen. El anticuerpo inmunoglobulina M (IgM) existe en dos formas, IgM de secreción e IgM de unión a membrana, que difieren en los extremos carboxilo terminal de sus cadenas pesadas. Un gen lleva la información genética de ambos tipos de cadenas pesadas; el final del gen corresponde al polipéptido C-terminal que se muestra en la parte superior de la figura. Este DNA tiene dos posibles sitios de adición de poli(A), donde pueden terminar los tránscritos de RNA y se pueden usar cuatro exones en dos configuraciones alternativas. Los cortes y empalmes de los tránscritos primarios se indican con símbolos en forma de V. El patrón de ayuste que utiliza la unión del exón 4 y retiene los exones 5 y 6, da lugar a la síntesis de las cadenas pesadas de IgM, que quedan en la membrana por un dominio de anclaje codificado por los exones 5 y 6. El producto alternativo es secretado porque no se lleva a cabo el corte y empalme del exón 4 y el tránscrito termina tras el exón 4.

evidencia de que el proceso de exportación está estrechamente acoplado al ayuste del RNA, procede de experimentos en los que se eliminaron artificialmente intrones de genes purificados, antes de introducir de nuevo estos genes en células intactas. Aunque se vio que los genes alterados eran transcritos activamente, sus tránscritos no se exportaban desde el núcleo a no ser que estuviese presente inicialmente al menos un intrón. Los experimentos con el HIV, el virus causante del SIDA, han proporcionado incluso mejores evidencias de que la exportación de RNAs puede ser controlada selectivamente. Hay un tipo de molécula de RNA codificada por el HIV que se sintetiza en el núcleo y permanece ahí hasta que se produce una proteína denominada Rev. La secuencia de aminoácidos de Rev incluye una *señal de exportación nuclear*, que permite a la proteína guiar al RNA viral, a través de los poros nucleares, hacia el citoplasma.

La tasa de traducción puede ser controlada por factores de iniciación y represores de la traducción

Una vez que las moléculas de mRNA se han exportado desde el núcleo al citoplasma, hay varios mecanismos de control de la traducción, que pueden regular la tasa a la que cada mRNA se traduce en su correspondiente producto polipeptídico. Algunos mecanismos de control de la traducción funcionan alterando los ribosomas o los factores de síntesis de proteínas; otros regulan la actividad o estabilidad del propio mRNA. El control de la traducción se da, tanto en procariotas, como en eucariotas, pero vamos a centrarnos en varios ejemplos en eucariotas.

Un ejemplo bien estudiado de control de la traducción se da en los eritrocitos en desarrollo, donde las cadenas del polipéptido *globina* son el principal producto de la traducción. La síntesis de globina depende de la disponibilidad del grupo *hemo*, el grupo prostético que contiene hierro y que enlaza las cadenas de globina para dar lugar al producto final, la hemoglobina. Los eritrocitos en desarrollo normalmente presentan altas tasas de síntesis de globina. Sin embargo, la síntesis de globina sería inútil si no hubiese disponible suficiente grupo hemo para completar las moléculas de hemoglobina, de modo que los eritrocitos han desarrollado un mecanismo para ajustar la síntesis de polipéptidos en función de la disponibilidad de hemo.

El mecanismo implica a una protein quinasa, denominada **inhibidor controlado por hemo (HCI)**, cuya actividad está regulada por hemo. La Figura 23.32 muestra cómo funciona HCI. En presencia del grupo hemo, HCI es inactivo, pero en su ausencia, HCI fosforila específicamente, y por lo tanto inhibe a eIF2 (el factor 2 de iniciación en eucariotas), una de las distintas proteínas requeridas para la iniciación. EIF2 fosforilada no puede formar el complejo con el GTP metionil tRNA necesario para la iniciación de la transcripción (*véase* Capítulo 22). Dado que eIF2 está implicado en la traducción de todos los mRNAs eucariotas, este mecanismo de inhibición de eIF2 en ausencia del grupo hemo, influye en toda la actividad de la traducción de la célula. Sin embargo, las cadenas de globina suponen más del 90% de los polipéptidos producidos por los eritrocitos en desarrollo, de manera que el principal efecto del HCI se produce en la síntesis de globina de los eritrocitos. Se han detectado otros inhibidores de la traducción que fosforilan eIF2 en distintos tipos de células eucariotas, lo que sugiere que la fosforilación de eIF2 es un modo relativamente habitual de regulación de la traducción.

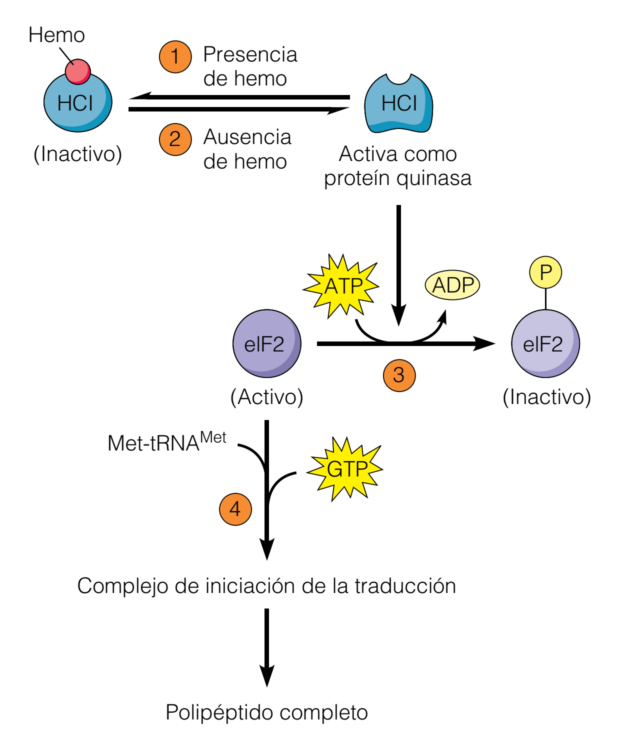


Figura 23.32 Regulación de la traducción por el grupo hemo en eritrocitos en desarrollo. La principal función de los eritrocitos en desarrollo es la síntesis de hemoglobina, que consta de cuatro polipéptidos de globina y un grupo prostético hemo. Estas células contienen la proteína HCI (inbidor controlado por hemo), que regula esta síntesis en función de la disponibilidad de hemo. ① Cuando hemo está presente se une a HCI, activándolo. ② Cuando hemo está ausente, HCI es activo. ③ HCI activo funciona como una quinasa que cataliza la fosforilación de eIF2, un factor clave en el inicio de la traducción. EIF2 fosforilado es inactivo; no se puede combinar con el metionil tRNA y GTP, para formar el complejo de iniciación de la traducción. Así, en ausencia del grupo hemo, la traducción de todos los mRNAs de la célula está inhibida. El principal efecto se ejerce en la síntesis de globina, porque los mRNAs de globina constituyen la mayor parte de los mRNAs de la celula. ④ Cuando el grupo hemo está presente tiene lugar la traducción del mRNA. Las nuevas globinas se combinan con el grupo hemo, para dar lugar a las moléculas de hemoglobina (no mostrado).

El uso de la fosforilación de proteínas para controlar las tasas de traducción no está restringido a eIF2. El factor de iniciación eucariota eIF4F, que se une al casquete de 5′del mRNA, también está regulado por fosforilación, aunque en este caso la fosforilación activa en lugar de inhibir al

factor de iniciación. Un ejemplo de este tipo de control se observa en las células infectadas por adenovirus, que inhibe la síntesis proteica de las células infectadas favoreciendo la defosforilación de eIF4F. También pueden ser controlados por fosforilación otros factores de iniciación y elongación implicados en la síntesis de proteínas eucariotas, asi como varias de las aminoacil-tRNA sintetasas que unen los aminoácidos a sus respectivos tRNAs.

Los distintos tipos de control de la traducción vistos hasta ahora son relativamente inespecíficos, en el sentido de que afectan a las tasas de traducción de todos los mRNAs de la célula. Un ejemplo de un tipo más específico de control de la traducción se encuentra en la *ferritina*, una proteína almacenadora de hierro, cuya síntesis se estimula selectivamente en presencia de dicho metal. La clave de esta estimulación selectiva se encuentra en la secuencia líder 5′ no traducida del mRNA de la ferritina, que contiene un segmento de 28 nucleótidos —el **elemento de respuesta a hierro (IRE)**— que forma una horquilla necesaria para la estimulación de la síntesis de ferritina por hierro. Si se inserta experimentalmente la secuencia IRE en un gen cuya expresión no está regulada normalmente por hierro, la traducción del mRNA resultante se vuelve sensible al hierro.

La Figura 23.33 muestra cómo funciona la secuencia IRE. Cuando la concentración de hierro es baja (panel de la izquierda), una proteína reguladora denominada *proteína de unión a IRE* se une a la secuencia IRE del mRNA de la ferritina, evitando que el mRNA forme el complejo de iniciación con las subunidades ribosómicas. Pero la proteína de unión a IRE es una proteína alostérica, cuya actividad puede ser controlada por la unión del hierro. Cuando hay más disponibilidad de hierro (panel de la derecha), la proteína liga un átomo de hierro y experimenta un cambio conformacional que imposibilita su unión a IRE, permitiendo así la traducción del mRNA. Por lo tanto, la proteína de unión a IRE es un ejemplo de un **represor** de la traducción que controla selectivamente la traducción de un determinado mRNA. Este tipo de control de la traducción permite a la célula responder a cambios específicos en las condiciones ambientales más rápidamente de lo que sería posible por control transcripcional.

La traducción también puede estar controlada por la regulación de la vida media del mRNA

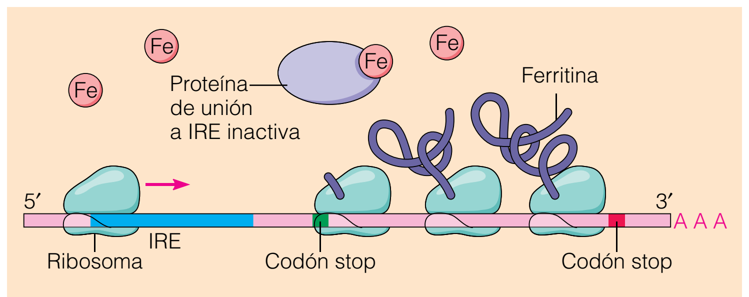
Las tasas de traducción también pueden estar sujetas a control por alteraciones en la estabilidad del mRNA —en otras palabras, cuanto más rápido se degrade la molécula de mRNA, menos tiempo está disponible para ser traducida—. La vida media, o tiempo requerido para que el 50% de la cantidad de RNA se degrade, varía mucho entre los distintos mRNAs eucariotas, oscilando desde los 30 minutos o menos en los mRNAs de algunos factores de crecimiento hasta las 10 horas en los mRNAs que codifican la β-globina. La longitud de la cola de poli(A) es uno de los factores que influyen en el control de la estabilidad del mRNA. Los RNAs mensajeros con colas de poli(A) cortas tienden a ser menos estables que los mRNAs con colas más largas. En algunos casos, la estabilidad del mRNA también está influenciada por características de la región 3′ no transcrita. Por ejemplo, los mRNAs de corta vida media de varios factores de crecimiento tienen una secuencia rica en AU en esta región. La secuencia rica en AU desencadena la eliminación de la cola de poli(A) por enzimas degradativas. Cuando la secuencia rica en AU se transfiere al extremo 3′ del mensajero de la globina, normalmente estable, usando técnicas de DNA recombinante, el mRNA híbrido presenta la corta vida media típica del mRNA de un factor de crecimiento.

Se puede encontrar un mecanismo alternativo de regulación de la estabilidad del mRNA en la acción del hierro que, además de participar en el control de la traducción como se ha descrito, influye en el control de la degradación del mRNA. La adquisición de hierro en las células de ma-

Baja concentración de hierro

Elemento de respuesta a hierro (IRE)
Proteína de unión a IRE activa
5′
3′
A A A
RNAm de la ferritina
Codón stop
Codón stop

La proteína de unión a IRE se une a IRE; síntesis de la ferritina baja



La proteína de unión a IRE no puede unirse a IRE; síntesis de ferritina alta

Figura 23.33 Control de la tradución en la respuesta a hierro. La iniciación de la traducción del mRNA de la ferritina está inhibida por la unión de la proteína ligante de IRE a una horquilla que puede formar en un elemento de respuesta a hierro (IRE) de la secuencia líder 5′ no transcrita del mRNA. La proteína de unión a IRE es alostérica. Cuando el hierro se une a ella, la proteína de unión a IRE cambia a una conformación que no reconoce a IRE. Así, en presencia de hierro, los ribosomas se pueden ensamblar en el mRNA y traducirlo.

mífero está mediada por una proteína receptora de la membrana plasmática denominada *receptor transferrina*. Cuando hay escasez de hierro, la síntesis del receptor transferrina se estimula mediante un mecanismo que protege al mRNA de la transferrina de la degradación, haciendo así que más moléculas de mRNA estén disponibles para la traducción. Como se muestra en la Figura 23.34, este mecanismo de control implica un IRE (similar al del mRNA de la ferritina) localizado en la región 3′ no traducida del mRNA de la transferrina. Cuando los niveles de hierro intracelular son bajos (panel de la izquierda) y es necesario incrementar la toma de hierro, la proteína de unión a IRE se une a este IRE y protege al mRNA de la degradación. Cuando los niveles de hierro en la célula son altos (panel de la derecha) y no es necesario tomar más, la proteína de unión a IRE se une a un átomo de hierro y se disocia del mRNA, permitiendo que el mRNA se degrade. Como resultado, disminuye la síntesis del receptor transferrina, lo que conduce a una disminución de la tasa de transporte de hierro hacia el interior de la célula.

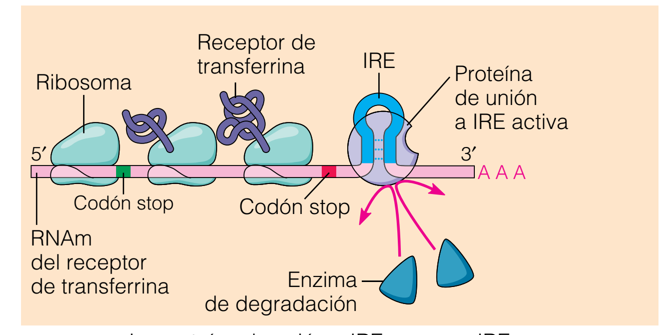
La interferencia por RNA utiliza RNAs cortos para silenciar la expresión de genes que contienen secuencias de bases complementarias

Las proteínas reguladoras que se unen a mRNAs específicos —como es el caso de la proteína de unión a IRE— no son las únicas moléculas usadas por las células para controlar la actividad del mRNA. Los mRNAs también pueden estar controlados por un tipo especial de moléculas cortas de RNA, que inhiben la expresión de aquellos mRNAs que contienen secuencias relacionadas con tales secuencias cortas. Esta inhibición mediada por RNA, conocida como **interferencia por RNA**, está basada en la capacidad de RNAs pequeños para facilitar la degradación del mRNA, o inhibir la traducción del mRNA o inhibir la transcripción del gen que codifica un determinado mRNA.

El primer tipo de interferencia por RNA que se descubrió aparece como respuesta a la introducción de RNA de cadena doble. Por ejemplo, si se infectan plantas con virus que producen RNA dicatenario como parte de su ciclo viral, el mecanismo de interferencia por RNA acaba con la expresión de los genes virales y por lo tanto limita la infección viral. Pero este efecto se limita a genes virales. Si se modifica genéticamente un virus para que contenga un gen normal de una planta, las células infectadas con el virus inhiben la expresión de su propia copia del mismo gen.

En la Figura 23.35 se representa el mecanismo que permite a un RNA de doble cadena silenciar la expresión de genes específicos. Primero, una ribonucleasa conocida como **Dicer**, corta el RNA de cadena doble en pequeños fragmentos de unas 21-22 pares de bases. Los fragmentos de RNA resultantes, denominados siRNA (small interfering RNA, RNA pequeños interferencial) se combinan entonces con un conjunto de proteínas para dar lugar a un complejo conocido como **RISC** (complejo de silenciación inducida por RNA). Tras ser incorporada en un RISC, una de las dos cadenas del siRNA se degrada. El RNA de cadena sencilla que queda, se une después a una molécula de mRNA diana, en el contexto del complejo RISC y mediante apareamiento de bases complementarias.

Si el apareamiento entre el siRNA y el mRNA es perfecto (o casi perfecto), el mRNA es degradado por Slicer, una ribonucleasa del complejo RISC que corta el mRNA en medio de la secuencia complementaria. Si el apareamiento entre siRNA y mRNA no es perfecto, la traducción del mRNA puede ser inhibida sin que se degrade el mRNA. En algunos casos, RISC llega a entrar en el núcleo y ser



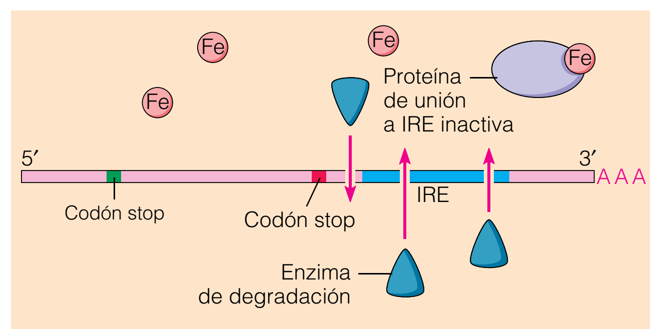


Figura 23.34 Control de la degradación del mRNA en respuesta a hierro. La degradación del mRNA del receptor de transferrina, una proteína necesaria para la entrada de hierro en la célula, está regulada por la misma proteína alostérica de unión a IRE que se muestra en la Figura 23.33. El mRNA del receptor de transferrina tiene un IRE en la región 3′ no traducida. Cuando la concentración de hierro intracelular es baja, la proteína de unión a IRE permanece unida al IRE, protegiendo al mRNA de la degradación y permitiendo que se sintetice más receptor de transferrina. Cuando el nivel de hierro es alto, los átomos de hierro se unen a la proteína de unión a IRE, haciendo que abandone el IRE; el mRNA se vuelve así vulnerable a la acción de enzimas de degradación.

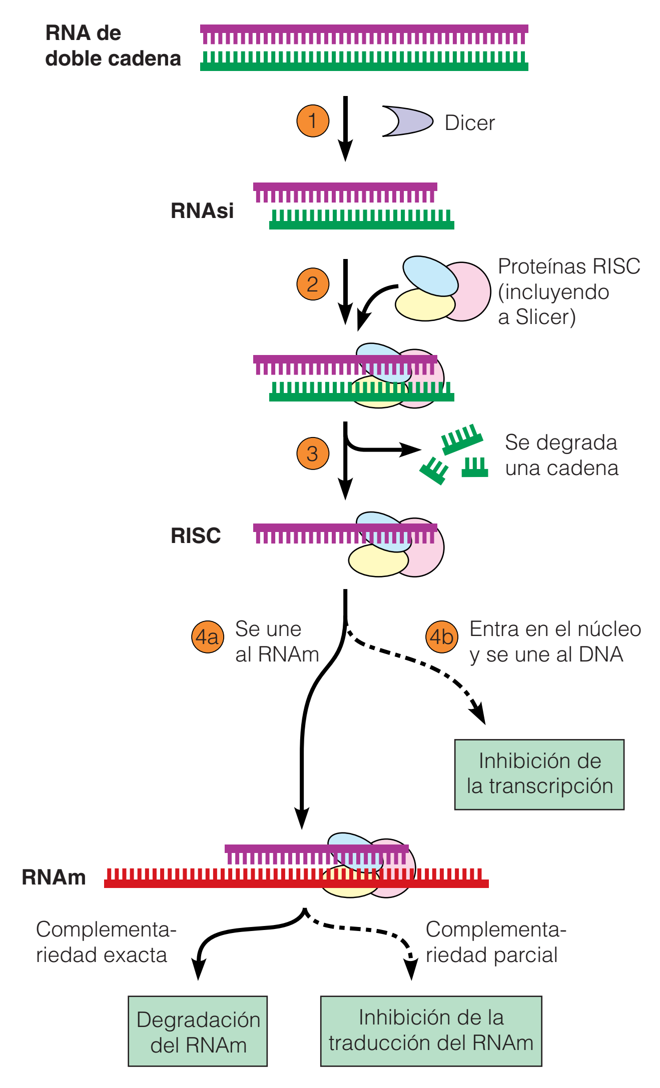


Figura 23.35 Interferencia de RNA mediante RNA de doble cadena. Cuando una célula encuentra un RNA de doble cadena, ① la enzima Dicer corta el RNA en siRNAs de unos 21-22 pares de bases. El siRNA resultante ② se combina con proteínas RISC y ③ una de las dos cadenas del RNA se degrada. La cadena de siRNA que queda, se une después, por complementariedad de bases, al mRNA diana ④a en el citoplasma o una secuencia diana de DNA ④b en el núcleo, silenciando así la expresión génica a nivel de la traducción o la transcripción. La situación más común (indicada en flechas continuas) es la de complementariedad exacta entre el siRNA y un mRNA, que activa la degradación del mRNA por Slicer, una enzima componente de RISC.

guiado por sus siRNAs hasta secuencias de DNA nucleares complementarias. Tras la asociación con estas secuencias, RISC silencia su expresión estimulando la metilación del DNA o reclutando una enzima que añade grupos metilo a las histonas, desencadenando así la formación de la cromatina condensada, transcripcionalmente inactiva (heterocromatina).

El RNA de interferencia podría haber aparecido originalmente como un mecanismo para proteger a la célula de virus que utilizan RNA de doble cadena. Sin embargo, ha resultado ser una poderosa herramienta de laboratorio que permite a los científicos inactivar cualquier gen que quieran estudiar. Ya que hoy está disponible la secuencia del genoma de muchos organismos, se puede explorar sistemáticamente la función de cualquier gen utilizando la interferencia por RNA para inactivarlo. Los investigadores simplemente sintetizan (o encargan) pequeños siRNAs que son complementarios a secuencias presentes en los genes que quieren silenciar. La introducción de estos siRNAs en células permite inactivar genes individuales. Para demostrar el enorme poder de esta aproximación, los siRNAs ya se han usado para desactivar uno a uno los 19.000 genes del gusano *C. elegans*.

Los microRNAs producidos por genes celulares normales silencian la traducción de RNAs mensajeros importantes para el desarrollo

El hallazgo de que la expresión génica puede ser silenciada por la introducción de RNAs de doble cadena en las células plantea la cuestión de si cualquier gen normal produce RNAs que funcionan de forma comparable. La búsqueda de estas moléculas ha llevado al descubrimiento de los **microRNAs (miRNAs)**, un tipo de RNA de cadena sencilla de unos 21-22 nucleótidos, producidos en genes que se han encontrado en todos los organismos pluricelulares estudiados hasta ahora.

Los microRNAs se unen y regulan la expresión de los RNAs mensajeros producidos por genes que están separados de los genes que producen los microRNAs.

Como se ve en la Figura 23.36, los genes que producen microRNAs son transcritos inicialmente a moléculas de RNA más largas, denominadas *microRNAs primarios (pri-miRNA)*, que se pliegan formando horquillas. Los pri-miRNAs plegados se convierten después en miRNAs maduros, por procesamiento secuencial. Primero, una enzima nuclear denominada **Drosha** corta el miRNA en RNAs en horquilla más pequeños, denominados *microRNAs precursores (pre-miRNA)*, de unos 70 nucleótidos. Los pre-miRNA son después exportados al citoplasma, donde Dicer los corta en microRNAs maduros de cadena sencilla de unos 21-22 nucleótidos.

Cada microRNA se ensambla con un grupo de proteínas para formar un complejo ribonucleoproteico (miRNP) que a su vez silencia la expresión de RNAs mensajeros que contienen secuencias complementarias a las del microRNA. En algunos casos, el apareamiento es exactamente complementario y el RNA mensajero es destruido por un mecanismo similar al observado con los siRNAs. Sin embargo, es más común que los microRNAs exhiban complementariedad parcial con el RNA mensajero. Esta unión inhibe la traducción en lugar de inducir la degradación del RNA, pero su efecto inhibitorio requiere normalmente la unión de muchos microRNAs a distintos sitios parcialmente complementarios dentro de un RNA mensajero determinado.

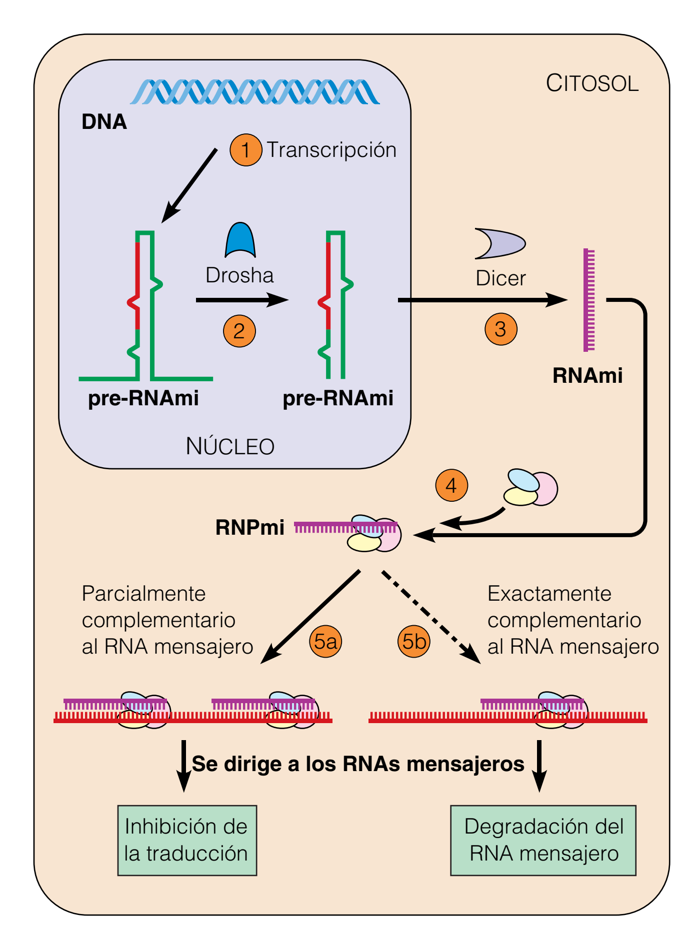


Figura 23.36 Silenciamiento de la traducción por microRNAs. Los microRNAs son producidos por genes celulares normales mediante un proceso de varios pasos. ① En el primer paso, un gen de microRNA se transcribe en un tránscrito primario inicial, denominado pri-miRNA, que se pliega formando una horquilla. ② La enzima nuclear Drosha corta el pri-miRNA en una horquilla más pequeña (de unos 70 nucleótidos) denominada pre-miRNA, que se exporta desde el núcleo y ③ es cortada por Dicer para formar un microRNA maduro de cadena sencilla (miRNA), que se une después a un grupo de proteínas para dar lugar a un complejo ribonucleoproteico (miRNP). ④ La miRNP es dirigida por su miRNA al RNA mensajero que contiene la secuencia complementaria de dicho miRNA. ⑤a En la situación más común, muchas miRNPs se unen al mismo RNA mensajero, mediante secuencias parcialmente complementarias, inhiendo la transcripción. ⑤b Ocasionalmente, el miRNA es exactamente complementario de un sitio interno del RNA mensajero, lo que tiene como resultado el corte y degradación del RNA mediante un mecanismo similar al observado en los siRNAs.

Los genes que codifican microRNAs representan alrededor de un 0,5%-1% del número total de genes presentes en los genomas de los organismos pluricelulares estudiados hasta ahora. Por ejemplo, ya se han detectado en el hombre unos 200-250 genes de microRNAs y alrededor de 120 en gusanos. Muchos de los microRNAs producidos por estos genes controlan la actividad de los RNAs mensajeros que codifican proteínas importantes para el desarrollo del organismo.

El control después de la transcripción implica modificaciones en la estructura, función y degradación de las proteínas

Una vez que la traducción de una molécula de mRNA ha producido una cadena polipeptídica, hay muchas formas distintas de regular la actividad del producto polipeptídico. Esto nos lleva al nivel final de control de la expresión, fundamentalmente los distintos **mecanismos de control después de la traducción**, que participan en la modificación de la estructura y función de las proteínas (*véase* Figura 23.11, paso ⑤). En esta categoría se incluyen las alteraciones estructurales que influyen en la función de la proteína, como la fosforilación y defosforilación, y alteraciones permanentes, como el procesamiento proteolítico. Otros procesos postraducción sujetos a regulación, incluyen el plegamiento de las proteínas por medio de chaperonas, el direccionamiento de proteínas hacia localizaciones intra y extracelulares y la interacción de las proteínas con moléculas reguladoras o iones, como el cAMP o el Ca^{2+}. Este tipo de procesos postranslacionales se citan en otros sitios en contextos distintos, pero vamos a mencionarlos de nuevo para hacer énfasis en que el flujo de información en la célula no está completo hasta que esté disponible el adecuado producto génico funcional.

Hasta ahora nos hemos centrado en los mecanismos de control que influyen en la tasa de producción de un producto proteico funcional. Pero la cantidad de cada proteína presente en la célula en un momento dado, es función de su tasa de degradación, así como de su tasa de síntesis. En suma, la regulación de la tasa de degradación de las proteínas también es un importante modo de regular la expresión génica.

Las contribuciones relativas de las tasas de síntesis y degradación proteica en la determinación de la concentración de cualquier proteína en la célula se pueden expresar mediante la siguiente ecuación:

$$P = \frac{K_s}{K_d} \qquad \textbf{(23.1)}$$

donde P es la cantidad de una determinada proteína presente, K_s es la constante de la tasa de síntesis, y K_d la constante de la tasa de degradación. Las tasas de las constantes de síntesis y degradación suelen expresarse en forma de vida media, que corresponde a la cantidad de tiempo necesario para que la mitad de las moléculas de proteína que están presentes en un determinado momento, se degraden. La vida media de las proteínas celulares puede ser tan corta como unos pocos minutos y tan largas como varias semanas. Estas diferencias en la vida media tienen efectos drásticos en la capacidad de distintas proteínas para responder a condiciones variables.

En las células de hígado expuestas a la hormona esteroídica cortisona, se encuentra un interesante ejemplo. La

cortisona estimula la síntesis de distintas enzimas metabólicas. Cuando se examina el efecto de la cortisona en dos enzimas implicadas en el metabolismo de los aminoácidos, la *triptófano pirrolasa* y la *arginasa*, se observa una interesante diferencia: la concentración de triptófano pirrolasa se incrementa rápidamente diez veces, mientras que la concentración de arginasa se incrementa sólo ligeramente. A primera vista, estos datos parecían indicar que la cortisona estimula selectivamente la síntesis de triptófano pirrolasa. Sin embargo, la cortisona estimula la síntesis de la triptófano pirrolasa y la arginasa en la misma medida. La explicación de esta aparente paradoja es que la triptófano pirrolasa tiene una vida media mucho más corta (mayor K_d) que la arginasa. Usando la relación matemática de la Ecuación 23.1, los cálculos muestran que la concentración de una proteína con una corta vida media (mayor K_d) cambia más drásticamente en respuesta a alteraciones de la tasa de síntesis que la concentración de una proteína con una vida media más larga. Por esta razón, las enzimas que son importantes en la regulación metabólica tienden a tener vidas medias cortas, lo que permite que las concentraciones intracelulares aumenten rápidamente o decrezcan en respuesta a condiciones cambiantes.

Aunque los factores que determinan las tasas de degradación de las proteínas no se conocen bien, está claro que el proceso está sujeto a regulación. En ratas en ayuno, por ejemplo, la cantidad de la enzima arginasa en el hígado se dobla a los pocos días sin un cambio correspondiente en la tasa de síntesis de arginasa. La explicación de este incremento es que la degradación de la arginasa disminuye drásticamente en ratas hambrientas. Este efecto es altamente selectivo; la mayoría de las proteínas se degradan más rápidamente, no más lentamente, en los animales hambrientos (Figura 23.37).

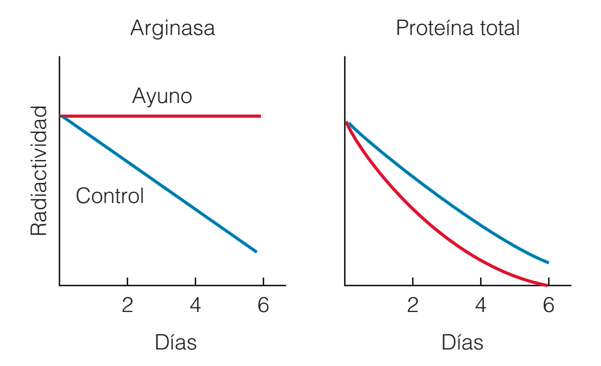


Figura 23.37 Regulación de la tasa de degradación de la enzima arginasa en el hígado. La tasa de degradación de la enzima arginasa se midió inyectando aminoácidos radiactivos en ratas, para marcar radiactivamente las proteínas y medir después la velocidad a la que se pierde la radiactividad de las enzimas. Los datos revelan que la degradación de la arginasa se inhibe en ratas en ayuno, mientras que la tasa de degradación proteica total se ve ligeramente incrementada.

La ubicuitina marca las proteínas para su degradación en los proteosomas

El ejemplo anterior plantea la cuestión de cómo se regula selectivamente la degradación de determinadas proteínas. El método más común para proceder a la destrucción de las proteínas, es la asociación a **ubicuitina**, una pequeña proteína de 76 aminoácidos. La ubicuitina se une a la proteína diana mediante un proceso que implica tres componentes: una *enzima activadora de ubicuitina* (E1), *una enzima que conjuga ubicuitina* (E2) y una *proteína de reconocimiento de sustrato* (E3). Como se muestra en la Figura 23.38, la ubicuitina se activa primero por unión a E1 en una reacción dependiente de ATP. Una vez activada, se transfiere después a E2 y se une, en una reacción facilitada por E3, a un residuo de lisina en la proteína diana. Más tarde se añaden a la secuencia moléculas adicionales de ubicuitina, formándose cadenas cortas.

Estas cadenas ubicuitinadas sirven como señales que son reconocidas por grandes estructuras que degradan proteínas, denominadas **proteosomas**. Los proteosomas son fundamentalmente proteasas (enzimas que degradan proteínas) del citosol, que suelen estar presentes a altas concentraciones, y que suponen más del 1% del conjunto de las proteínas celulares. Cada proteosoma tiene una masa de alrededor de dos millones de daltons y consta de media docena de proteasas asociadas a varias ATPasas y de un sitio de unión a las cadenas de ubicuitina. Con forma de cilindro corto, el proteosoma se une a proteínas ubicuitinadas y elimina su cadena de ubicuitinas. Las proteínas se dirigen luego al canal central del proteosoma y sus enlaces peptídicos son hidrolizados en un proceso dependiente de ATP, generando pequeños péptidos que se liberan por el lado opuesto del cilindro.

La clave de la regulación de la degradación proteica está en la capacidad de seleccionar proteínas concretas para la ubicuitinación. Esta selectividad procede en parte de la existencia de múltiples formas de E3, que dirigen la unión de ubicuitina a distintas proteínas diana. Una característica reconocible por las distintas formas de E3 es el aminoácido presente en el extremo N-terminal de la potencial proteína diana. Algunos aminoácidos N-terminales hacen que las proteínas sean rápidamente ubicuitinadas y degradadas; otros hacen a las proteínas menos susceptibles.

Hay unas secuencias de aminoácidos internas, denominadas **degrones**, que también permiten que determinadas proteínas sean seleccionadas para la destrucción. Por ejemplo, en el Capítulo 19 vimos que la progresión de los estadios finales de la mitosis está controlada por el complejo promotor de la anafase, que selecciona determinadas proteínas, como la ciclina mitótica, para la degradación. El complejo promotor de la anafase lleva a cabo esta tarea funcionando como una proteína de reconocimiento de sustrato (E3) que se une a las proteínas diana que contienen un determinado tipo de degrón, lo que promueve la

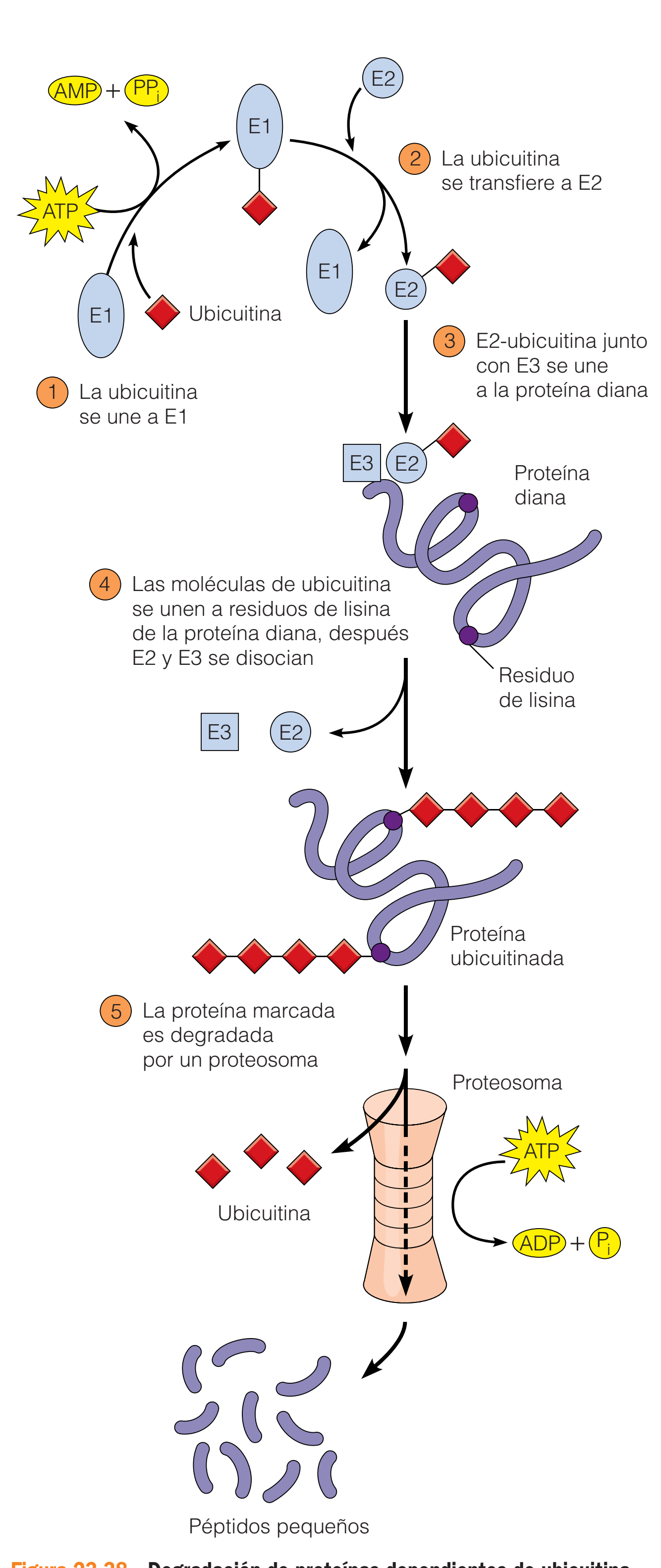


Figura 23.38 **Degradación de proteínas dependientes de ubicuitina.** ① La ubicuitina se une primero a la enzima E1 en una reacción que depende de ATP. ② La molécula de ubicuitina se transfiere después a la enzima E2, que ③ se une, junto con E3, al extremo N-terminal de una proteína que debe ser degradada. ④ Las moléculas de ubicuitina se unen a residuos de lisina de la proteína. ⑤ El proteosoma libera la ubicuitina para su reutilización y degrada la proteína diana en pequeños péptidos mediante otra reacción dependiente de ATP.

ubicuitinación de estas proteínas por E2 y su consiguiente degradación en los proteosomas. Además de estos mecanismos selectivos de degradación de proteínas específicas en determinados momentos, los proteosomas tienen también un importante papel en los mecanismos generales de eliminación de proteínas deficientes de las células. En observaciones recientes se ha apreciado que más del 30% de las proteínas sintetizadas de novo son de algún modo deficientes, por lo que se marcan inmediatamente con ubicuitina, desencadenándose su destrucción en el proteosoma.

Aunque la ruta de la ubiquitín-proteosoma es el principal mecanismo que utilizan las células para degradar proteínas, no es el único del que disponen. En el Capítulo 12 vimos que los lisosomas contienen enzimas digestivas que degradan todos los tipos fundamentales de macromoléculas, incluyendo proteínas. Los lisosomas pueden tomar y degradar proteínas citosólicas mediante una invaginación de la membrana lisosomal, generando pequeñas vesículas que se internalizan en el lisosoma y son degradadas por enzimas hidrolíticas del orgánulo. Este proceso de **microautofagia** tiende a ser bastante poco selectivo en las proteínas que degrada. El resultado es un reciclaje lento pero continuo de aminoácidos, que se encuentra en la mayoría de las proteínas celulares. Bajo condiciones de estrés, sin embargo, esta degradación no selectiva de proteínas sería perjudicial para la célula. Por ejemplo, durante el ayuno prolongado, la continua degradación no selectiva de proteínas podría suponer la pérdida de enzimas críticas o de proteínas reguladoras. En estas condiciones, los lisosomas degradan preferentemente proteínas que contienen una secuencia señal que consta de una glutamina flanqueada en cada lado por un tetrapéptido compuesto por aminoácidos muy básicos, muy ácidos o muy hidrófobos. Las proteínas que presentan esta secuencia están marcadas para ser degradadas selectivamente, presumiblemente porque no son indispensables para la célula.

Resumen de la degradación eucariota

Ya hemos visto que la regulación génica en eucariotas implica a un amplio conjunto de mecanismos de control que operan a cinco niveles (la Figura 23.11 es un resumen visual). El primer nivel de regulación, el *control genómico*, incluye alteraciones en el DNA (amplificación, deleción, reordenamientos y metilación), descondensación de la cromatina, acetilación de histonas, cambios en las proteínas HMG y conexiones alteradas con la matriz nuclear. El segundo nivel, el *control transcripcional*, implica interacciones específicas entre factores de transcripción reguladores y varios tipos de elementos de control del DNA, que permiten que se activen y desactiven genes específicos en distintos tejidos y en respuesta a condiciones variables. El tercer nivel implica el control del *procesamiento del RNA y la exportación nuclear* por mecanismos como el ayuste alternativo y la exportación regulada de mRNA a través de los poros

nucleares. El cuarto nivel, el *control* de la traducción, incluye mecanismos para modificar la actividad los factores de síntesis de proteínas y para controlar la traducción de mRNAs específicos mediante represores de la traducciones o tasas de degradación diferenciales. Por último, el quinto nivel implica mecanismos de *control después de la traducción* que alteran reversible o permanentemente la estructura de las proteínas y su función, así como mecanismos para controlar las tasas de degradación de las proteínas.

Así, cuando se lee que una determinada alteración en la función celular o en el comportamiento está basada en un «cambio en la expresión génica», se debería entender que la explicación subyacente podría implicar mecanismos de uno o varios de estos niveles de control.

Perspectiva

La mayoría de los genes no se están expresando siempre. Así, además de conocer cómo se expresa la información genética en las células, necesitamos conocer cómo está regulada la expresión. En los procariotas, los genes regulados coordinadamente suelen estar agrupados en operones, y la regulación se ejerce principalmente a nivel de la transcripción. Los operones son activados o desactivados en respuesta a las necesidades celulares. En general, los operones que codifican enzimas de las rutas catabólicas son inducibles; su transcripción está activada específicamente por la presencia del sustrato. Los operones que codifican enzimas anabólicas, por otra parte, están sujetos a represión; la transcripción es inactivada específicamente en presencia del producto final. Ambos tipos de regulación son llevados a cabo por proteínas represoras alostéricas que ejercen un control negativo uniéndose al operador y evitando la transcripción de genes asociados.

Algunos operones que codifican enzimas catabólicas también presentan lugares de control en el DNA que responden al control positivo por el receptor de cAMP (CRP). Este mecanismo permite la desactivación del operón en presencia de glucosa, asegurando la utilización preferencial del azúcar. El efecto de la glucosa está mediado por cAMP, el efector alostérico de CRP. Algunos operones que codifican enzimas anabólicas, como las de la biosíntesis de aminoácidos, contienen una secuencia líder que puede atenuar la transcripción cuando está disponible el aminoácido correspondiente. Las secuencias líder del mRNA también pueden contener ribointerruptores que se unen a pequeñas moléculas, alterando las configuraciones en bucle que a su vez influyen en la terminación de la transcripción, o de la iniciación, o de la traducción.

La regulación es más complicada en eucariotas debido al tamaño y la complejidad estructural del genoma eucariota, así como a la intrincada naturaleza de los procesos de desarrollo y diferenciación celular en los organismos pluricelulares. Por regla general, todas las células de los organismos pluricelulares contienen el mismo conjunto de genes, aunque algunos procesos como la amplificación del DNA, la deleción, los reordenamientos y la metilación pueden introducir alteraciones. La activación de los genes probablemente implica una descondensación selectiva de la cromatina. Este cambio estructural se puede observar al microscopio en los cromosomas politénicos gigantes de las glándulas salivales de insectos, pero probablemente es un fenómeno general. Una vez desenrollado, el DNA está más accesible a las RNA polimerasas y a los factores proteicos necesarios para la iniciación de la transcripción. Tanto en los eucariotas como en los procariotas, la iniciación de la transcripción es probablemente el punto de control más importante para la expresión génica. La iniciación de la transcripción génica está controlada por la unión de factores de transcripción reguladores a varios tipos de secuencias de control del DNA. Entre estas secuencias son especialmente importantes los elementos de respuesta al DNA, que permiten una regulación coordinada de genes no adyacentes. Por ejemplo, los elementos de respuesta hormonal coordinan la expresión de genes activados por elevadas temperaturas y otros elementos estresantes.

Además de la regulación transcripcional, las células poseen numerosos mecanismos para el control de la expresión génica a nivel postraducción. En los eucariotas, donde los controles postranscripcionales están especialmente bien desarrollados, estos mecanismos incluyen la capacidad de generar múltiples mRNAs a partir del mismo gen mediante ayuste alternativo; mecanismos generales, así como mRNA-específicos, para regular la traducción y degradación del mRNA; y modulación postranslacional de la estructura de las proteínas, su actividad y su degradación. Aunque la interacción de proteínas reguladoras con secuencias de DNA y RNA específicas tiene un papel fundamental en muchos de estos mecanismos de control de la expresión génica, recientemente se ha descubierto que ciertos tipos de RNAs pequeños (siRNA y microRNAs), pueden regular también la expresión de determinados genes mediante un proceso conocido como interferencia por RNA. Uniéndose a secuencias complementarias de un mRNA específico (o, en algunos casos, a DNA), estos pequeños RNA silencian la traducción y transcripción de genes concretos.

Problemas

Los problemas de mayor dificultad están marcados con un •.

23.1 Trabajando con *lac*. La mayor parte de lo que conocemos sobre el operón *lac* de *E. coli* viene del análisis genético de varios mutantes. En la siguiente lista están los genotipos de siete cepas de *E. coli*. Para cada cepa, indique si el producto del gen *Z* se expresará en presencia o ausencia de lactosa. Explique su razonamiento en cada caso.

(a) $I^+P^+O^+Z^+$

(b) $I^sP^+O^+Z^+$

(c) $I^+P^+O^cZ^+$

(d) $I^- P^+ O^+ Z^+$

(e) $I^s P^+ O^c Z^+$

(f) $I^+ P^- O^+ Z^+$

(g) Igual que el apartado (**a**), pero en presencia de glucosa.

•**23.2 El procariota encurtidor**. *Pickelensia hipothetica* es un procariota imaginario que convierte una amplia variedad de fuentes de carbono a etanol cuando se cultiva anaerobiamente en ausencia de etanol. Sin embargo, cuando se añade etanol al medio de cultivo, el organismo paraliza su propia producción de etanol y fabrica lactato. Se han aislado varias cepas de *Pickelensia* que difieren en su capacidad de sintetizar etanol. Los mutantes de clase I no pueden sintetizar etanol en absoluto. Las mutaciones de este tipo se localizan en dos loci, *A* y *B*. Los mutantes de clase II, por otra parte, son constitutivos para la síntesis de etanol: continúan produciendo etanol tanto si está presente en el medio como si no lo está. Las mutaciones de este tipo se localizan en los loci *C* y *D*. Las cepas de *Pickelensia* modificadas para ser diploides en el operón etanol presentan los siguientes genotipos y fenotipos:

$A^+ B^- D^+ / A^- B^+ C^+ D^+$ inducible
$A^+ B^+ C^+ D^- / A^+ B^+ C^+ D^+$ inducible
$A^+ B^+ C^+ D^+ / A^+ B^+ C^- D^+$ constitutiva

(a) Identifique cada uno de los cuatro loci genéticos del operón

(b) Indique el fenotipo esperado para cada una de las siguientes cepas parcialmente diploides:

(i) $A^- B^+ C^+ D^+ / A^- B^+ C^+ D^-$

(ii) $A^+ B^- C^+ D^+ / A^- B^+ C^+ D^-$

(iii) $A^+ B^+ C^+ D^- / A^- B^- C^- D^+$

(iv) $A^- B^+ C^- D^+ / A^+ B^- C^+ D^+$

•**23.3 Regulación del metabolismo de la belicosa**. Las enzimas belicosa quinasa y belicosa fosfato deshidrogenasa están reguladas coordinadamente en la bacteria *Hokus focus*. Los genes que codifican estas proteínas, *belA* y *belB*, son segmentos contiguos en el mapa genético del organismo. En sus trabajos pioneros en este sistema, la profesora Jean X. Pression estableció que la bacteria puede crecer con el monosacárido belicosa como única fuente de carbono y energía, que las dos enzimas implicadas en el catabolismo de la belicosa sólo son sintetizadas por la bacteria cuando la belicosa está presente en el medio y que la producción de enzimas se paraliza en presencia de glucosa. La profesora identificó algunas mutaciones que reducían o eliminaban la producción enzimática y mostró que estas mutaciones se podían agrupar en dos clases. Los mutantes de clase I son elementos que actúan en *cis*, mientras que los de clase II se localizan a distancia de los genes que codifican las enzimas que actúan en *trans*. Hasta ahora, las únicas mutaciones constitutivas que Pression ha encontrado son deleciones que conectan *belA* y *belB* a otro DNA situado por delante de *belA*. La siguiente es una lista de conclusiones que le gustaría obtener de sus observaciones. Indique en cada caso si la conclusión es consistente con los datos (C), inconsistente con los datos (I) o irrelevante para los datos obtenidos (X).

(a) La belicosa puede ser metabolizada por *H. focus* para dar lugar a ATP.

(b) La producción de enzimas por los genes *belA* y *belB* está bajo control positivo.

(c) La fosforilación de la belicosa hace al azúcar menos permeable al transporte a través de la membrana.

(d) El operador el operón de la belicosa está localizado por delante del promotor.

(e) Algunas mutaciones de clase I pueden estar en el promotor.

(f) Algunas mutaciones de clase II pueden estar en el operador.

(g) Entre las mutaciones de clase II se pueden incluir mutaciones en el gen que codifica CRP.

(h) Las deleciones constitutivas conectan los genes *belA* y *belB* a un nuevo promotor.

(i) La expresión del operón belicosa está sujeta a regulación por atenuación.

23.4 La atenuación en 25 palabras o menos. Complete cada una de las siguientes afirmaciones sobre la atenuación del operón *trp* de *E. coli* en 25 palabras o menos.

(a) La secuencia líder se puede considerar un terminador condicional porque…

(b) Cuando el producto de un gen del operón no es necesario, el extremo 5′del mRNA forma una estructura secundaria que…

(c) En nuestro conocimiento del mecanismo de atenuación está implícita la asunción de que los ribosomas siguen muy de cerca a la RNA polimerasa. Este «seguimiento» es esencial en el modelo porque…

(d) Las medidas de las tasas de síntesis indican que la traducción es normalmente más rápida que la transcripción. Esto apoya el mecanismo de atenuación propuesto porque…

(e) Si el operón que codifica las enzimas de la ruta biosintética para el aminoácido X está sujeto a este tipo de atenuación, la secuencia líder probablemente codifica un polipéptido que…

(f) La atenuación tiene sentido como mecanismo de regulación de los operones que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis de un aminoácido porque...

(g) La atenuación de este tipo probablemente no es un mecanismo de regulación de la expresión génica en eucariotas porque…

23.5 Control positivo y negativo. Asuma que tiene un cultivo de células de *E. coli* creciendo en el medio B, que contiene lactosa y glucosa. A tiempo *t*, el 33% de las células se transfieren al medio L, que contiene lactosa pero no glucosa; el 33% se transfieren al medio G, que contiene glucosa pero no lactosa; y las células restantes permanecen en el medio B. Para cada una de las siguientes afirmaciones, indique con una L si es cierta para las células transferidas al medio L, con una G si es cierto para las células transferidas al medio G, con una B si es cierto para las células que han permanecido en el medio B y con una N si no es cierto para ninguna de las células. En algunos casos, puede ser válida más de una letra.

(a) La tasa de consumo de glucosa por célula es aproximadamente la misma después de un tiempo *t* que antes.

(b) La tasa de consumo de lactosa es más alta después de un tiempo *t* que antes.

(c) El nivel de cAMP intracelular es más bajo después de un tiempo *t* que antes.

(d) La mayor parte de los sitios del operador lac tienen proteínas represoras lac unidas a ellos.

(e) La mayor parte de los receptores de cAMP existen como complejos CRP-cAMP.

(f) La mayor parte de los represores *lac* existen como complejos represor-glucosa.

(g) La tasa de transcripción del operón *lac* es mayor después de un tiempo *t* que antes.

(h) El operón *lac* tiene a CRP y el represor unidos.

•**23.6 Cromosomas politénicos.** La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* tiene unas 2×10^8 pares de bases de DNA por cromosoma haploide, de los cuales alrededor de un 75% es DNA no repetido. El DNA se distribuye entre cuatro pares de cromosomas homólogos, que tienen un total de unas 5.000 bandas visibles cuando el politénico se forma en la glándula salival. El número de genes estimados inicialmente a partir de análisis mutacional era de unos 5.000, pero estudios más recientes sugieren que el número de genes es algo mayor.

(a) ¿Por qué se especuló que cada banda correspondía a un solo gen? ¿Qué sugiere esto sobre el número de proteínas distintas que puede sintetizar *Drosophila*? ¿Le parece un número razonable?

(b) Asumiendo que todo el DNA no repetido está uniformemente distribuido por los cromosomas, ¿cuánto DNA no repetido (en pares de bases) tiene en promedio cada banda?

(c) ¿Cuánto DNA se necesitará para codificar un polipéptido con un peso molecular de 50.000? (Asuma que los aminoácidos tienen un peso molecular medio de 110.) ¿Qué proporción representa sobre el total de DNA no repetido en una banda?

23.7 Potenciadores. Un potenciador puede incrementar la frecuencia de iniciación de la transcripción al estar asociado a un gen cuando… (Indique verdadero o falso en cada afirmación, y explique su respuesta.)

(a) Está localizado 1.000 nucleótidos delante del núcleo del promotor del gen.

(b) Está en la región codificante del gen.

(c) No está presente el promotor.

(d) Hace que se forme un bucle en el DNA.

(e) Induce ayuste alternativo del DNA.

23.8 Amplificación génica. El ejemplo mejor estudiado de amplificación génica implica a los genes que codifican RNA ribosomal durante la oogénesis de *Xenopus laevis*. El número de genes de RNA ribosómico no amplificados es de unos 500 por genoma haploide. Tras la amplificación, el oocito contiene unos 500.000 genes de RNA ribosómico por genoma haploide. Este nivel de amplificación es necesario, aparentemente, para permitir que el huevo sintetice los 10^{12} ribosomas que acumula durante los dos meses que dura la oogénesis en esta especie. Cada gen de RNA ribosómico consta de unos 13.000 pares de bases, y el tamaño del genoma de *Xenopus* es de unas $2{,}7 \times 10^9$ pares de bases por genoma haploide.

(a) ¿Qué fracción del genoma haploide total representan las 500 copias de genes de RNA ribosómico?

(b) ¿Cuál es el tamaño total (en pares de bases) del genoma tras la amplificación de los genes de RNA ribosómico? ¿Qué proporción de éste representan los genes de RNA ribosómico amplificados?

(c) Asuma que todos los genes de RNA ribosómico en el oocito amplificado se transcriben continuamente para generar el número de ribosomas necesarios durante los dos meses de la oogenésis. ¿Cuánto duraría la oogénesis si no se amplificaran estos genes?

(d) ¿Por qué cree que es necesario amplificar los genes cuando el producto requerido por la célula es RNA, pero no cuando es una proteína?

•**23.9 Hormonas esteroídicas.** Se sabe que las hormonas esteroídicas incrementan la expresión de genes específicos de las células diana. Por ejemplo, la testosterona incrementa la producción de una proteína denominada α2-microglobulina en el hígado y la hidrocortisona (un tipo de glucocorticoide) incrementa la producción de la enzima tirosina aminotransferasa en el hígado.

(a) Basándose en su conocimiento general de la acción de la hormona esteroídica, explique cómo estas dos hormonas son capaces de influir selectivamente en la expresión de dos proteínas distintas del mismo tejido.

(b) Antes de la administración de testosterona o hidrocortisona, las células del hígado están expuestas a puromicina (un inhibidor de la síntesis de proteínas) o α-amanitina (un inhibidor de la RNA polimerasa II). ¿Cómo esperaría que afectasen estos tratamientos a las acciones de la testosterona y la hidrocortisona?

(c) Suponga que lleva a cabo un experimento de cambio de dominio en el que usa técnicas de DNA recombinante para cambiar los dominios de dedos de zinc del receptor de la testosterona y los de los receptores de glucocorticoides entre sí. ¿Qué efectos esperaría que tuviesen la testosterona y la hidrocortisona en las células que contienen estos receptores alterados?

(d) Si se usan técnicas de DNA recombinante para sustituir un elemento de respuesta a testosterona por el elemento de respuesta a glucocorticoides, que se localiza normalmente al lado del gen de la tirosina aminotransferasa en las células del hígado, ¿qué efectos esperaría que tuviesen la testosterona y la hidrocortisona en estas células, genéticamente alteradas?

23.10 Genes homeóticos. Los genes homeóticos se consideran cruciales para el desarrollo primario en *Drosophila* porque… (Indique verdadero o falso para cada afirmación y explique su respuesta.)

(a) Codifican proteínas que contienen dominios de dedos de zinc.

(b) Las mutaciones en los genes homeóticos son siempre letales.

(c) Controlan la expresión de muchos otros genes necesarios para el desarrollo.

(d) Son idénticos en todos los eucariotas.

(e) Las proteínas homeodominio actúan ejerciendo una influencia en la degradación del mRNA.

•**23.11 Degradación de las proteínas.** Vimos en el Capítulo 19 que la ciclina mitótica es un ejemplo de una proteína selectivamente degradada en un determinado momento del ciclo celular, fundamentalmente al final de la anafase. Suponga que usa técnicas de DNA recombinante para generar un mutante de la ciclina mitótica, que no se degrade al final de la anafase.

(a) El análisis de la secuencia de la ciclina mitótica mutante muestra que se ha perdido un conjunto de nueve aminoácidos cerca de un extremo de la molécula. Basándose en esta información, enuncie al menos tres explicaciones posibles al hecho de que esta forma de la ciclina mitótica no sea degradada al final de la anafase.

(b) ¿Qué tipo de experimentos realizaría para distinguir entre estas posibles explicaciones?

(c) Suponga que descubre células que contienen una mutación en una segunda proteína, y sabe que esta mutación también hace que la ciclina mitótica no sea degradada al final de la mitosis, incluso aunque la ciclina mitótica sea normal. La degradación de otras proteínas de la célula parece darse de forma normal. ¿Qué clase de proteína que presente esta mutación puede explicar estos resultados?

23.12 Niveles de control. Asuma que los tejidos del hígado y el riñón de un mismo ratón contienen unas 10.000 especies de mRNA citosólico, pero sólo el 25% de éstos son comunes a ambos tejidos.

(a) Sugiera alguna aproximación experimental que se pueda usar para establecer qué tipo de moléculas de mRNA son comunes a ambos tejidos y cuáles no.

(b) Una posible explicación de estos datos es que se da una transcripción diferencial en los núcleos de hígado y riñón. ¿Qué otra explicación es posible? Describa un experimento que le permita distinguir entre estas posibilidades.

(c) Si se ha visto que todas las moléculas de mRNA son comunes a hígado y riñon y se sabe que estos dos tejidos sintetizan distintas proteínas, ¿qué nivel de control asumiría que se está dando?

•**23.13 Más sobre los niveles de control.** Si un huevo de rana se expone a un inhibidor de la síntesis de RNA durante los primeros estadios del desarrollo embrionario, la síntesis de proteínas no está inhibida y continúa el desarrollo. Sin embargo, si se añade el mismo inhibidor en fases posteriores del desarrollo embrionario, la síntesis de proteínas disminuye drásticamente y se paraliza el desarrollo embrionario. ¿Cómo explicaría esta observación?

Bibliografía recomendada

Las referencias con importancia histórica están marcadas con •.

Regulación génica en procariotas

Gruber, T. M. y C. A. Gross. Multiple sigma units and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu. Rev. Microbiol.* 57 (2003): 441.

•Jacob, F. y J. Monod. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3 (1961): 318.

Losick, R. y A. L. Sonenshein. Turning gene regulation on its head. *Science* 293 (2001): 2018.

Nudler, E. y A. S. Mironov. The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 29 (2004): 11.

Yanofsky, C. Transcription attenuation: once viewed as a novel regulatory strategy. *J. Bacteriol.* 182 (2000): 1.

Regulación génica en eucariotas: control genómico

Gibbs, W. W. The unseen genome: beyond DNA. *Sci. Amer.* 289 (diciembre de 2003): 106.

Jones, P. A. y D. Takai. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 293 (2001): 1068.

Turner, B. M. Cellular memory and the histone code. *Cell* 111 (2002): 285.

Regulación génica en eucariotas: control transcripcional

Carey, M. The enhanceosome and transcriptional synergy. *Cell* 92 (1998): 5.

Kadonaga, J. T. Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell* 116 (2004): 247.

Levy, D. E. y J. E. Darnell, Jr. STATs: transcriptional control and biological impact. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* 3 (2002): 651.

Mayr, B. y M. Montminy. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* 2 (2001): 599.

McGinnis, W. y M. Kuziora. The molecular architects of body design. *Sci. Amer.* 270 (febrero de 1994): 58.

McKnight, S. L. Molecular zippers in gene regulation. *Sci. Amer.* 264 (abril de 1991): 54.

Narlikar, G. J., H.-Y. Fan y R. E. Kingston. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108 (2002): 475.

Rhodes, D. y A. Klug. Zinc fingers. *Sci. Amer.* 268 (febrero de 1993): 56.

Taatjes, D. J., M. T. Marr y R. Tjian. Regulatory diversity among metazoan co-activator complexes. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* 5 (2004): 403.

Tjian, R. Molecular machines that control genes. *Sci. Amer.* 272 (febrero de 1995): 54.

Welch, W. J. How cells respond to stress. *Sci. Amer.* 268 (mayo de 1993): 56.

Regulación génica en eucariotas: control postranscripcional

Black, D. L. Mechanism of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.* 72 (2003): 291.

Dever, T. E. Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* 108 (2002): 545.

Eccleston, A. y A. K. Eggleston, eds. Nature Insight: RNA Interference. *Nature* 431 (2004): 337-378.
Goldberg, A. L., S. J. Elledge y J. W. Harper. The cellular chamber of doom. *Sci. Amer.* 284 (enero de 2001): 68.
Hammond, S. M., A. A. Caudy y G. J. Hannon. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nature Reviews Genetics* 2 (2001): 110.
Nakahara, K. y R. W. Carthew. Expanding roles for miRNAs and siRNAs in cell regulation. *Current Opinion Cell Biol.* 16 (2004): 127.
Novina, C. D. y P. A. Sharp. The RNAi revolution. *Nature* 430 (2004): 161.
Sach, A. B. y S. Buratowski. Common themes in translational and transcriptional regulation. *Trends Biochem. Sci.* 22 (1997): 189.
Weissman, A. M. Themes and variations on ubiquitylation. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* 2 (2001): 169.
Wilkie, G. S., K. S. Dickson y N. K. Gray. Regulation of mRNA translation by 5′- and 3′-UTR-binding factors. *Trends Biochem. Sci.* 28 (2003): 182.
Wilusz, C. J., M. Wormington y S. W. Peltz. The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* 2 (2001): 237.

Células madre y clonación

Vogel, G. Scientists take step toward therapeutic cloning. *Science* 303 (2004): 937.
Wilmut, I. Cloning for medicine. *Sci. Amer.* 279 (diciembre de 1998): 58.
Wilmut, I. *et al.* Somatic cell nuclear transfer. *Nature* 419 (2002): 583.



24

Células cancerosas

Cualquiera que esté familiarizado con los acontecimientos que se producen en el interior de una célula debe sentirse abrumado por las complejidades que implica. Dado el enorme de número de actividades que es necesario coordinar en las células, no debe sorprender que ocasionalmente se produzcan errores. El cáncer es un claro ejemplo de una enfermedad que se produce como consecuencia de una función celular anormal. Si la tendencia actual continúa, casi la mitad de la población de Estados Unidos desarrollará finalmente cáncer, haciendo de éste la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares.

Aunque nuestros conocimientos sobre los defectos genéticos y moleculares que conducen al cáncer no están completos todavía, en los últimos años, se han realizado enormes progresos y hay razones para creer que nuestros crecientes conocimientos sobre esta pavorosa enfermedad nos conducirán finalmente a controlarla. En este capítulo exploraremos algunos de los avances experimentales que proporcionan las bases para ese optimismo. A medida que lo vayamos haciendo, se hará evidente que conocer el comportamiento de las células cancerosas requiere un conocimiento profundo del comportamiento de las células normales, y al contrario, investigar la biología del cáncer ha permitido profundizar nuestros conocimientos sobre las células normales.

Proliferación celular descontrolada

El término cáncer, que significa «cangrejo» en latín, fue acuñado por Hipócrates en el siglo V a.C. para describir enfermedades en las que los tejidos crecen y se diseminan de manera incontrolada por todo el organismo asfixiando finalmente la vida. El cáncer se puede originar en casi cualquier órgano; dependiendo del tipo celular implicado, se agrupan en varias categorías diferentes. **Carcinomas**, entre los que se encuentran cerca del 90% de todos los cánceres, surgen a partir de células epiteliales que cubren las superficies corporales externas e internas. El cáncer de pulmón, el cáncer de mama y el cáncer de colon son los más frecuentes de este tipo. **Sarcomas**, se desarrollan a partir de tejidos de soporte tales como el hueso, el cartílago, la grasa, el tejido conjuntivo y el músculo. Finalmente **linfomas** y **leucemias** surgen a partir de las células de origen sanguíneo y linfático, reservándose el término de *leucemia* para situaciones en las que las células cancerígenas residen y proliferan principalmente en el torrente circulatorio más que creciendo como masas sólidas de tejido.

Independientemente de dónde surja el cáncer, se define por una combinación de dos propiedades: la capacidad de las células para proliferar de una manera incontrolada y su capacidad para diseminarse por todo el organismo. Empezaremos el capítulo describiendo estas dos propiedades sucesivamente.

Los tumores se producen por una proliferación celular incontrolada en donde el equilibrio entre división celular y diferenciación celular se rompe

Un cáncer es un tipo de crecimiento tisular anormal en donde las células se dividen de manera relativamente autónoma e incontrolada conduciendo a un aumento progresivo del número de células en división. La masa resultante de tejido en crecimiento se denomina **tumor** (o *neoplasma*).

Aunque los tumores han escapado de los controles normales de la proliferación celular, las células tumorales no siempre se dividen más rápidamente que las células normales. El asunto crucial no es la velocidad de la división celular, sino el equilibrio entre la división celular y la diferenciación celular.

La *diferenciación celular* es el proceso por el cual las células adquieren sus propiedades especiales que distinguen a tipos celulares diferentes unos de otros (página 794). A medida que las células adquieren estos caracteres especiales, generalmente pierden la capacidad de dividirse. Para ilustrarlo, déjenos considerar brevemente la división celular y la diferenciación de la piel, donde las células nuevas sustituyen continuamente a las células envejecidas que se están perdiendo por la superficie corporal externa. Las nuevas células de reemplazo se generan en la *capa basal* de la piel por división celular (Figura 24.1, *superior*). Cada vez que una célula basal se divide, da lugar a dos células con destinos diferentes. Una de las células se queda en la capa basal y retiene la capacidad de división mientras que la otra célula pierde la capacidad de dividirse y diferenciarse a medida que deja la capa basal y se desplazan hacia la superficie externa de la piel. Durante el proceso de diferenciación, la célula en migración se aplana y empieza a fabricar *queratina*, una proteína estructural fibrosa que aporta fortaleza mecánica a las capas más externas de la piel.

Así en la piel normal, una de las dos células producidas en cada división celular se mantiene en la membrana basal, mientras que la otra se sale de la capa basal y sigue con la diferenciación, y pierde la capacidad de dividirse. Esta disposición asegura que no haya aumento en el número de células en división. Las divisiones celulares que se producen en la capa basal, simplemente generan nuevas células diferenciadas para sustituir a aquellas que se pierden por la superficie externa de la piel. Un fenómeno similar se produce en la médula ósea, donde la división celular crea nuevas células sanguíneas para sustituir las células sanguíneas envejecidas que se están destruyendo. Esto también sucede en el epitelio del tracto gastrointestinal, donde la división celular crea nuevas células para sustituir aquellas que se descaman de la superficie interna del estómago y de los intestinos. En cada una de estas situaciones, la división celular está cuidadosamente equilibrada con la diferenciación celular, de manera que no tenga lugar una acumulación neta de células en división.

En los tumores se rompe esta organización finamente equilibrada y la división celular se desacopla de la diferenciación celular. Como resultado de esto, algunas divisiones celulares dan lugar a dos células que a su vez continúan dividiéndose, alimentando por tanto un incremento progresivo del número de células en división (Figura 24.1, *inferior*). Si las células se dividen rápidamente, el tumor crecerá rápidamente; si las células se dividen más despacio, el tumor crecerá más lentamente. Pero independientemente de lo rápido o lento que se dividan las células, el tumor continuará creciendo dado que se están produciendo nue-

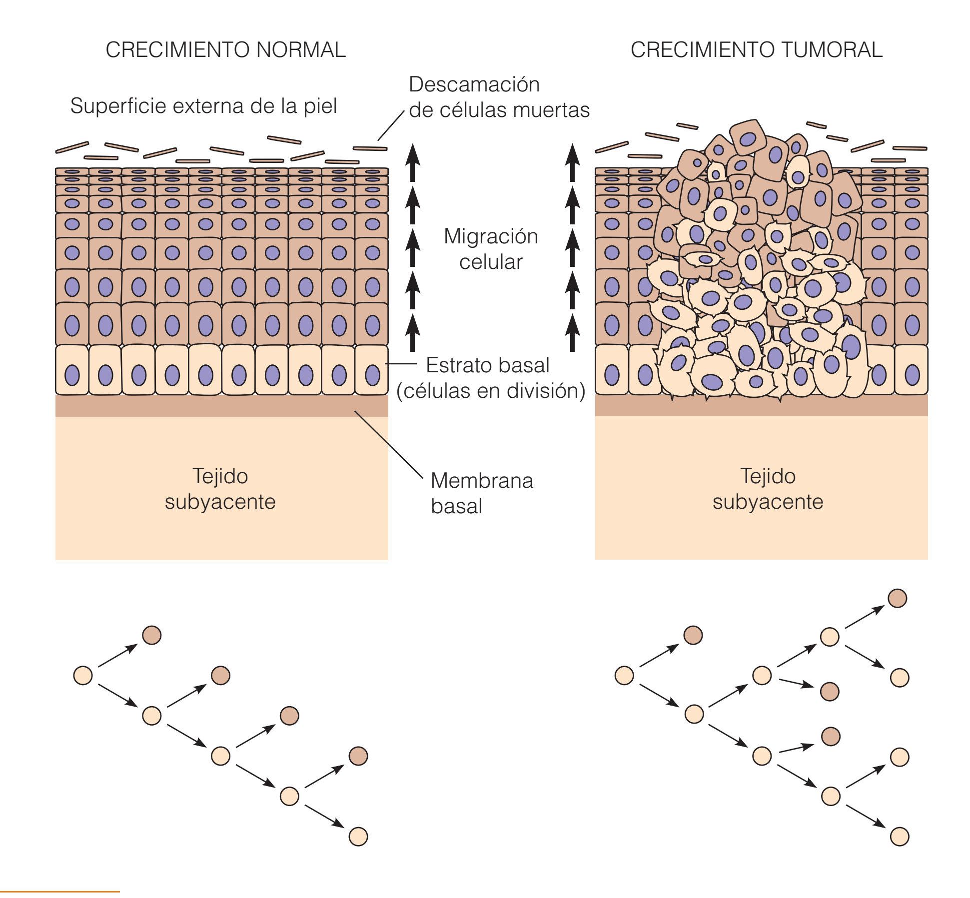


Figura 24.1 Comparación del crecimiento normal y el crecimiento tumoral en el epitelio de la piel. *(Superior izquierda)* En el crecimiento epitelial normal, la proliferación de las células situadas en la membrana basal da lugar a nuevas células que migran hacia la superficie externa de la piel, cambiando de forma y perdiendo la capacidad de dividirse. (*Superior derecha*) En el crecimiento tumoral, este proceso ordenado se altera y algunas de las células que migran hacia la superficie externa retienen la capacidad de dividirse. En ambos diagramas el sombreado en color claro se utiliza para identificar a las células que retienen la capacidad de dividirse. (*Inferior*) Diagrama esquemático que ilustra el destino de las células que se dividen. En la piel normal, cada división celular en la membrana basal da lugar a una célula que retiene la capacidad de dividirse (sombreado en color claro) y a una célula que se diferencia perdiendo la capacidad de dividirse. El resultado es que no se produce un acúmulo neto de células en división. En el crecimiento tumoral, la división celular no está apropiadamente equilibrada con la diferenciación celular, conduciendo de esta forma a un aumento progresivo en el número de células en división.

vas células en mayor número del necesario. Según se acumulan las células en división, se altera gradualmente la organización y función normales del tejido.

Basándose en diferencias en sus patrones de crecimiento, los tumores se clasifican como benignos o malignos. Un **tumor benigno** crece en un área delimitada y localizada y raramente es peligroso, mientras que un **tumor maligno** es capaz de invadir los tejidos circundantes, de entrar en el torrente circulatorio, y de diseminarse hacia partes distantes del cuerpo lo que lo convierte en una grave amenaza para la salud. El término **cáncer** se refiere a cualquier tumor maligno, es decir, cualquier tumor capaz de diseminarse desde su localización original hacia otros sitios. Ya que la capacidad de crecer de manera incontrolada y extenderse a lugares distantes hace del cáncer una enfermedad que potencialmente amenaza la vida, es importante entender los mecanismos que hacen posibles esas propiedades.

La proliferación celular en el cáncer es independiente de anclaje e insensible a la densidad de población

La proliferación celular en el cáncer presenta varias propiedades distintivas que la diferencian de la proliferación celular. Una propiedad, por supuesto, es la capacidad de formar tumores. Con las células cancerosas humanas, es difícil estudiar experimentalmente la formación de tumores, ya que no es ético inyectar células cancerosas en humanos para propósitos de investigación. Además, inyectar células humanas en animales, generalmente no es práctico ya que el sistema inmune del animal rechazará las células humanas simplemente porque son de origen extraño. Una forma de rodear el problema, es inyectar células humanas en cepas mutantes de ratón cuyos sistemas inmunes son incapaces de atacar y destruir células extrañas. Normalmente las células cancerosas humanas, inyectadas en tales animales inmunológicamente deficientes, formarán tumores sin ser rechazadas.

Además, las células cancerosas exhiben un número de otras propiedades de crecimiento distintivas que les permiten diferenciarse de las células normales. Por ejemplo, las células normales no crecen bien en cultivo, si se suspenden en un medio líquido o en un material semisólido como el agar blando; pero cuando se les proporciona una superficie sólida a la que pueden anclarse, las células se adhieren a la superficie, se dispersan y empiezan a proliferar. Por el contrario, las células cancerosas crecen bien no sólo cuando están ancladas a una superficie sólida sino también cuando están en suspensión en un medio líquido o semisólido. Se dice, por tanto, que las células cancerosas presentan crecimiento **independiente de anclaje**.

Cuando crecen en el organismo, la mayoría de las células normales satisfacen el requerimiento de anclaje, uniéndose a la matriz extracelular a través de proteínas de la superficie celular llamadas *integrinas* (página 536). Si se impide artificialmente el anclaje a la matriz utilizando productos químicos que bloquean la unión de las integrinas de la superficie celular a componentes de la matriz, las células normales generalmente pierden su capacidad de dividirse y en muchos casos se autodestruyen por *apoptosis* (un tipo de muerte celular programada descrita en la página 458). El desencadenamiento de la apoptosis en ausencia de un anclaje apropiado es una de las salvaguardas que impiden a las células normales desprenderse con éxito e instalarse y colonizar otro tejido. Dado que las células cancerosas son **independiente de anclaje** sortean esta garantía.

Otra propiedad que distingue las células cancerosas de las células normales es su respuesta a las condiciones de hacinamiento en cultivo. Cuando se cultivan células normales en el laboratorio, se dividen hasta que la superficie de la placa de cultivo se cubre por una capa simple de células. Una vez que se alcanza este *estadio de monocapa*, la división celular se detiene —fenómeno que se denomina **inhibición del crecimiento dependiente de la densidad—**. Las células cancerosas presentan una sensibilidad reducida a la inhibición del crecimiento dependiente de la densidad y, por tanto, normalmente no dejan de dividirse cuando alcanzan el estadio de monocapa. En vez de esto, las células cancerosas continúan dividiéndose y gradualmente comienzan a apilarse unas sobre otras.

Las células cancerosas se hacen inmortales por mecanismos que mantienen la longitud de los telómeros

Cuando se cultivan células normales usualmente se dividen un número limitado de veces. Por ejemplo, los fibroblastos humanos —un tipo celular cuyo comportamiento se ha estudiado extensamente— se dividen alrededor de 50-60 veces cuando se cultivan, después dejan de dividirse, sufren una variedad de cambios degenerativos y pueden incluso morir (Figura 24.2). Bajo condiciones similares, las células cancerosas no presentan tal limitación y continúan dividiéndose indefinidamente comportándose como si fueran inmortales. Un ejemplo llamativo lo proporcionan las células *HeLa* que se obtuvieron en 1953 de un cáncer uterino diagnosticado a una mujer llamada Henrietta Lacks (De ahí el término células «HeLa»). Después de que los cirujanos extirparon el tumor algunas de sus células se pusieron en cultivo. Rápidamente, las células en cultivo empezaron a proliferar y han continuado haciéndolo durante más de 50 años, dividiéndose más de 18.000 veces sin que parezca que vayan a detenerse.

¿Por qué las células cancerosas se reproducen indefinidamente en cultivo, mientras que las células humanas normales no se dividen más de 50-60 veces? La respuesta está relacionada con las secuencias de DNA telomérico que se pierden de los extremos de cada cromosoma en cada ciclo de replicación de DNA (página 622). Si una célula normal se divide varias veces, sus telómeros se vuelven demasiado cortos para proteger los extremos de los cromosomas y se

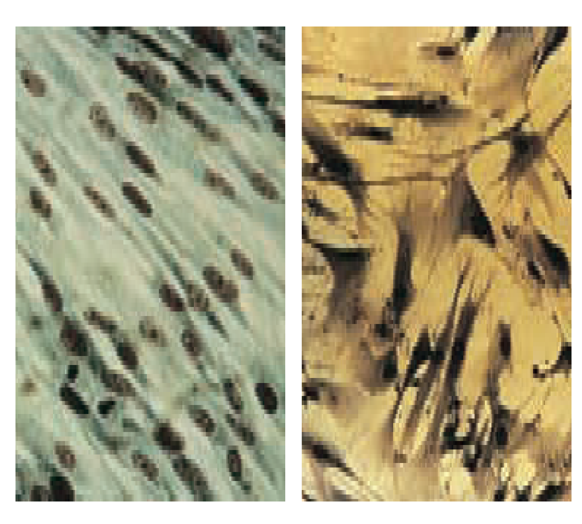


Figura 24.2 Apariencia microscópica de fibroblastos humanos jóvenes y viejos en cultivo. (*Izquierda*) Fibroblastos jóvenes que se han dividido en cultivo un número de veces relativamente pequeño y que muestran una forma fina y alargada. (*Derecha*) Después de dividirse unas 50 veces en cultivo, las células dejan de dividirse y sufren una variedad de cambios degenerativos. Fíjese en las evidentes diferencias de apariencia entre las células jóvenes (en división) y las más envejecidas (que no se dividen).

activa una ruta que detiene la división celular (y podría incluso destruir la célula por apoptosis). Esto impide una proliferación excesiva y descontrolada de células adultas y ayuda a explicar por qué los fibroblastos normales se dividen sólo 50-60 veces en cultivo.

En las poblaciones de células cancerosas el límite impuesto por los telómeros es superado por mecanismos que restablecen las secuencias teloméricas que desaparecen. La mayoría de las células cancerosas realizan esta proeza produciendo *telomerasa*, la enzima que añade secuencias de DNA telomérico a los extremos de las moléculas de DNA (página 622). Un mecanismo alternativo para mantener la longitud de los telómeros emplea enzimas que intercambian información entre cromosomas mediante intercambio de secuencias de DNA. Por un mecanismo o por otro, las células cancerosas mantienen la longitud de los telómeros por encima del umbral crítico y, por tanto, retienen la capacidad de dividirse de manera indefinida.

Las anomalías en la vía de señalización, en los controles del ciclo celular y en la apoptosis contribuyen a la proliferación descontrolada

Los mecanismos que mantienen la longitud de los telómeros desempeñan un papel permisivo al permitir que las células cancerosas continúen dividiéndose, pero en realidad no causan la división celular. Las anomalías que conducen a la actual proliferación de las células cancerosas se localizan como defectos en varios mecanismos de señalización que controlan la división celular. Los Capítulos 14 y 19 explicaron que la proliferación celular normalmente se regula por *factores de crecimiento* extracelulares que se unen a receptores de la superficie celular y que activan vías de señalización en las células blanco. Las células normales no proliferan si no son estimuladas por un factor de crecimiento apropiado, pero este mecanismo de contención se supera en las células cancerosas por defectos en la señalización (que se describirán en breve) que crean una señal constante de división.

Las alteraciones del control del ciclo celular también contribuyen a la proliferación incontrolada de las células cancerosas. En el Capítulo 19 mostramos cómo el compromiso para que avance el ciclo celular se realiza en el *punto de restricción*, que controla la progresión desde la fase G1 hacia la fase S. Si las células normales crecen bajo condiciones subóptimas (por ejemplo, insuficientes factores de crecimiento, elevada densidad celular ausencia de anclajes o nutrientes inadecuados), las células se detienen en el punto de restricción y dejan de dividirse. En situaciones comparables, las células cancerosas continúan proliferando; si las condiciones son extremadamente adversas, como sucede con la deprivación nutricional extrema, son más las células que finalmente mueren en puntos aleatorios del ciclo celular que las que se detienen en G1. La razón de este comportamiento anormal es que los controles del ciclo celular no funcionan apropiadamente en las células cancerosas. Además de fallar en la respuesta apropiada a los estímulos externos, las células cancerosas tampoco responden a las condiciones internas, tales como daños en el DNA, acontecimiento que normalmente dispararía los mecanismos de los puntos de control que detendrían el ciclo celular.

Otro factor que influye en el crecimiento de las células cancerosas es la velocidad a la que las células mueren. Si el mecanismo normal para que se dispare la muerte celular se altera, las células en proliferación se acumularían más rápidamente de lo que lo harían cuando la muerte celular se produce a la velocidad normal. El control de la muerte celular principalmente a través de rutas que disparan la apoptosis para deshacerse de las células innecesarias o defectuosas. Puesto que las células cancerosas se ajustan a la definición clásica de célula defectuosa o innecesaria —esto es, crecen de forma incontrolada y muestran daños en el DNA o en los cromosomas—, ¿por qué las células cancerosas no mueren por apoptosis? La respuesta es que las células cancerosas tienen varias maneras de bloquear las rutas que disparan la apoptosis; esto les permite sobrevivir y proliferar en condiciones que normalmente le provocarían la muerte celular.

Así pues, como vemos, la proliferación celular incontrolada es una propiedad compleja que surge de fallos en las rutas de señalización del crecimiento, en los controles del ciclo celular y en la apoptosis. Los defectos moleculares responsables de tales fallos se describirán posteriormente en el capítulo, cuando tratemos las clases de mutaciones génicas que conducen al cáncer.

Cómo se disemina el cáncer

Aunque la proliferación incontrolada es una característica que define a las células cancerosas, no es la propiedad que hace a la enfermedad tan peligrosa. Después de todo, las células de tumores benignos también proliferan de una forma incontrolada, pero tales tumores raramente son una amenaza para la vida puesto que las células se mantienen en su localización original y normalmente se pueden eliminar por cirugía. Los peligros que representan las células cancerosas proceden de la proliferación incontrolada *combinada con* la capacidad de dispersarse por todo el cuerpo. Lo siguiente será examinar los mecanismos que hacen que la diseminación de las células cancerosas sea posible.

Se requiere angiogénesis para que los tumores crezcan más allá de unos pocos milímetros de diámetro

Durante más de 100 años, los científicos han sabido que los tumores se abastecían mediante una densa red de vasos sanguíneos. Sin embargo, inicialmente, la mayoría de los investigadores creyeron que éstos eran o vasos preexistentes que se habían expandido en respuesta a la presencia de tumores o que eran parte de una respuesta inflamatoria diseñada para defender al hospedador contra el tumor. En 1971, Judah Folkman propuso una nueva idea con respecto a la importancia de los vasos sanguíneos en el desarrollo de los tumores. Sugirió que los tumores liberarían moléculas de señalización que dispararían la **angiogénesis** —es decir, el crecimiento de los vasos sanguíneos— en las inmediaciones del tejido hospedador, y que estos nuevos vasos se requerían para que los tumores crecieran más allá de un pequeño y localizado grupo de células.

Esta idea inicialmente se basaba en las observaciones realizadas en células cancerosas que habían crecido en órganos aislados bajo condiciones de laboratorio artificiales. En un experimento, a un conejo se le retiraba una glándula tiroidea normal y se colocaba en una cámara de vidrio, se inyectaban en la glándula un pequeño número de células cancerosas y se bombeaba en el órgano una solución de nutrientes para mantenerlo con vida (Figura 24.3, *izquierda*). En estas condiciones, las células cancerosas prolifera-

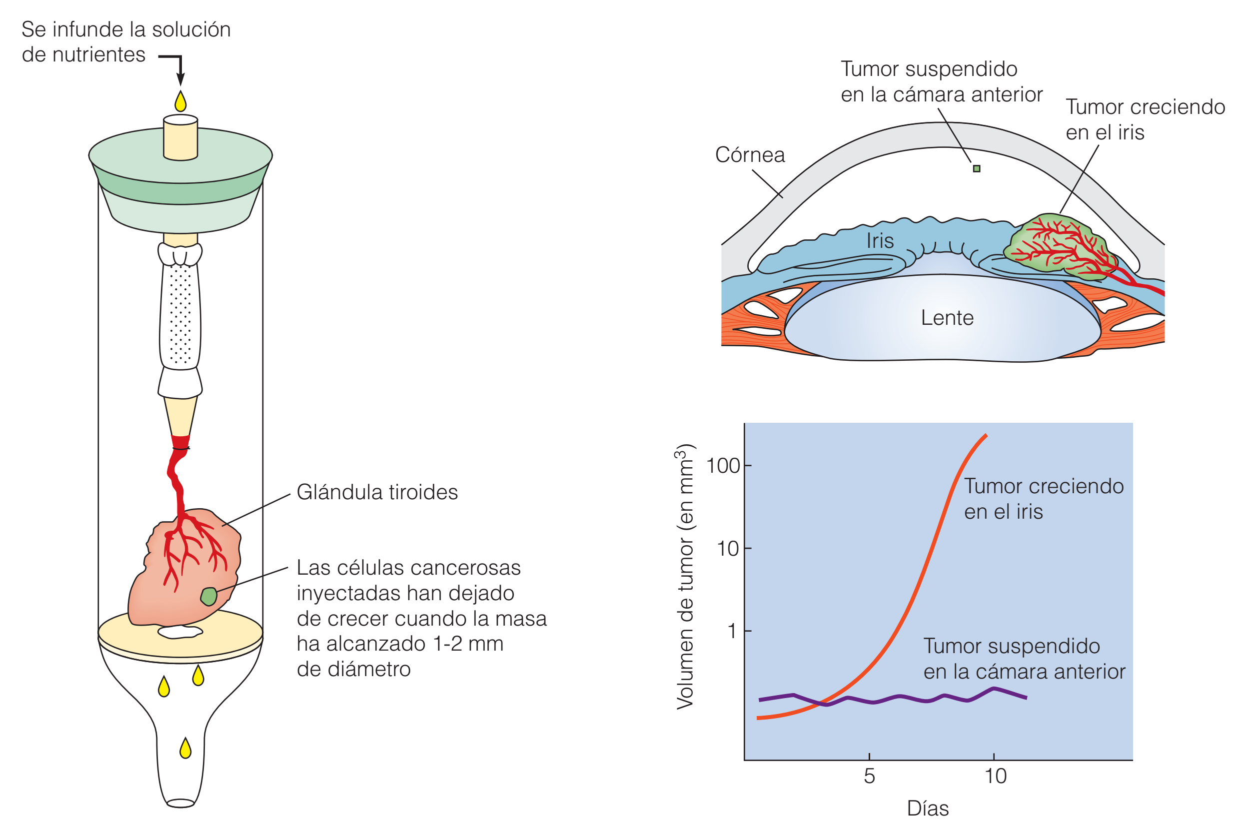


Figura 24.3 Dos experimentos que ilustran los requerimientos de la angiogénesis. (*Izquierda*) Las células cancerosas se inyectaron en una glándula tiroides de conejo aislada que se mantuvo viva bombeándole una solución de nutrientes en sus vasos sanguíneos principales. Las células tumorales no pudieron acoplarse a los vasos sanguíneos del órgano y la masa tumoral deja de crecer cuando alcanza un diámetro de aproximadamente 1-2 milímetros. (*Derecha*) Las células cancerosas se inyectaron o bien en la cámara anterior rellena de líquido de un ojo de conejo donde no hay vasos sanguíneos o se situaron directamente en el iris. Las células tumorales en la cámara anterior se alimentaban solamente por difusión, se mantienen vivas pero dejan de crecer antes de que el tumor alcance un milímetro de diámetro. Por el contrario, los vasos sanguíneos infiltran rápidamente las células cancerosas implantadas en el iris, permitiendo que los tumores crezcan miles de veces su masa original.

ban durante unos días pero detenían repentinamente su crecimiento cuando el tumor alcanzaba 1-2 mm de diámetro. Virtualmente cada tumor detenía su crecimiento, cuando alcanzaba exactamente el mismo tamaño, sugiriendo que algún tipo de limitación les permitía crecer sólo hasta ese punto.

Cuando las células tumorales se extirpaban de la glándula tiroidea y se reinyectaban en los animales, se reasumía la proliferación celular y se desarrollaban tumores masivos. ¿Qué es lo que hacía que los tumores detuviesen su crecimiento en un pequeño tamaño en la glándula tiroidea aislada y que continuasen creciendo de manera incontrolada en los animales vivos? Un examen más detallado hizo evidente una posible explicación. Los pequeños tumores, vivos pero aletargados en la glándula tiroides aislada, habían fracasado en el anclaje a los vasos sanguíneos del órgano; como resultado, los tumores habían detenido el crecimiento cuando alcanzaron un diámetro de 1-2 mm. Cuando se inyectaban en animales vivos, estos mismos tumores se vieron infiltrados por vasos sanguíneos y crecían alcanzando un enorme tamaño.

Para comprobar la teoría de que los vasos sanguíneos son necesarios para sustentar el crecimiento de un tumor, Folkman implantó células cancerosas en la cámara anterior del ojo de un conejo, donde no hay aporte sanguíneo. Como se muestra en la Figura 24.3 (*derecha*), las células cancerosas situadas en esta posición sobrevivían y formaban pequeños tumores, pero los vasos sanguíneos del iris cercano no podían alcanzar a las células y los tumores rápidamente dejaban de crecer. Cuando las mismas células se implantaban directamente en el tejido del iris, los vasos sanguíneos del iris se infiltraban rápidamente en las células tumorales y la masa de cada tumor crecía miles de veces su tamaño original. Una vez más, parecía que los tumores necesitaban un aporte sanguíneo para crecer por encima de una pequeña masa.

El crecimiento de los vasos sanguíneos está controlado por un equilibrio entre activadores e inhibidores de la angiogénesis

Si los tumores requieren vasos sanguíneos para sostener su crecimiento, ¿cómo se aseguran de satisfacer esa necesidad? La primera pista procedía de estudios en los que las células cancerosas se colocaban en el interior de una cámara rodeada por un filtro que poseía pequeños poros a través de los cuales las células no podían pasar. Cuando tales cámaras se implantaban en los animales, proliferaban nuevos capilares en el tejido hospedador circundante.

Investigaciones posteriores revelaron que las principales moléculas activadoras de la angiogénesis son proteínas denominadas *factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF* (del inglés, *vascular endothelial growth factor*) y el *factor de crecimiento de los fibroblastos, FGF* (del ingles, *fibroblast growth factor*). VEGF y FGF se producen por muchos tipos de células cancerosas, así como por varios tipos de células sanas. Cuando las células cancerosas liberan estas proteínas en el tejido circundante, se unen a proteínas receptoras de la superficie de las *células endoteliales* que forman el revestimiento de los vasos sanguíneos. Esta unión activa una ruta de señalización que provoca que las células endoteliales se dividan y secreten enziman que degradan proteínas denominadas *metaloproteinasas de la matriz, MMPs* (del inglés, *matrix metalloproteinases*). Las MMP deterioran componentes de la matriz extracelular permitiendo que las células endoteliales migren hacia los tejidos circundantes. A medida que migran, las células endoteliales en proliferación se organizan en tubos huecos que evolucionan a nuevas redes de vasos sanguíneos.

Aunque muchos tumores producen VEGF y /o FGF, no son la única explicación de la activación de la angiogénesis. Para que prosiga la angiogénesis, estas moléculas deben superar los efectos de los *inhibidores* de la angiogénesis que normalmente impiden el crecimiento de los vasos sanguíneos. Se han identificado más de una docena de inhibidores naturales de la angiogénesis, incluyendo a las proteínas *angiostatina, endostatina* y *trombospondina*. Un equilibrio extraordinariamente afinado entre la concentración de estos inhibidores de la angiogénesis y la concentración de los activadores (tales como el VEGF y el FGF) que determinará si un tumor inducirá el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. Cuando los tumores disparan el proceso de angiogénesis, normalmente lo realizará aumentando la producción de activadores de la angiogénesis y disminuyendo al mismo tiempo la producción de los inhibidores de la angiogénesis.

La diseminación del cáncer por invasión y metástasis es un proceso multietapas complejo

Una vez que se ha disparado el proceso de la angiogénesis en el emplazamiento inicial de un tumor, el escenario está preparado para que las células cancerosas se diseminen por todo el cuerpo. Esta capacidad de diseminarse se basa en dos mecanismos diferentes: invasión y metástasis. **Invasión** se refiere a la migración directa y a la penetración de las células cancerosas en tejidos vecinos, mientras que la **metástasis** implica la capacidad de las células cancerosas para entrar en el torrente circulatorio (u otros fluidos orgánicos) y viajar a lugares distantes, donde forman tumores —llamados *metástasis*— que no están físicamente conectados con el tumor primario.

La capacidad de un tumor de metastatizar depende de una compleja cascada de acontecimientos que empieza con la angiogénesis. Los acontecimientos que siguen a la angiogénesis pueden agruparse en tres etapas principales. Primero las células cancerosas invaden los tejidos circundantes y atraviesan las paredes de los vasos linfáticos y sanguíneos alcanzando así el torrente circulatorio. Segundo, las células cancerosas son transportadas por el sistema cir-

culatorio a través del cuerpo. Y tercero, las células cancerosas abandonan el torrente circulatorio y penetran en órganos particulares donde establecen nuevos tumores metastáticos (Figura 24.4). Si las células del tumor inicial no pueden completar alguna de estas etapas, o si se puede impedir alguna de ellas, no se producirán metástasis. Por tanto, es crucial entender cómo las células cancerosas hacen posibles estas etapas.

Los cambios en la adhesión celular, en la movilidad y en la producción de proteasas permiten que las células cancerosas invadan los tejidos y los vasos circundantes

La primera etapa de la metástasis implica que las células cancerosas invadan los tejidos y los vasos circundantes (Figura 24.4, paso ①). Esto significa que al contrario de las células de los tumores benignos o que la mayoría de las células normales, que permanecen juntas en la localización en la que se forman, las células cancerosas son capaces de abandonar su localización inicial y penetrar a través de las barreras titulares circundantes entrando finalmente en el sistema circulatorio.

Varios mecanismos hacen posible este comportamiento invasivo. El primero implica alteraciones en las proteínas de la superficie celular que hacen que las células se adhieran entre sí. Tales proteínas frecuentemente faltan o son deficientes en las células cancerosas, lo que permite a las

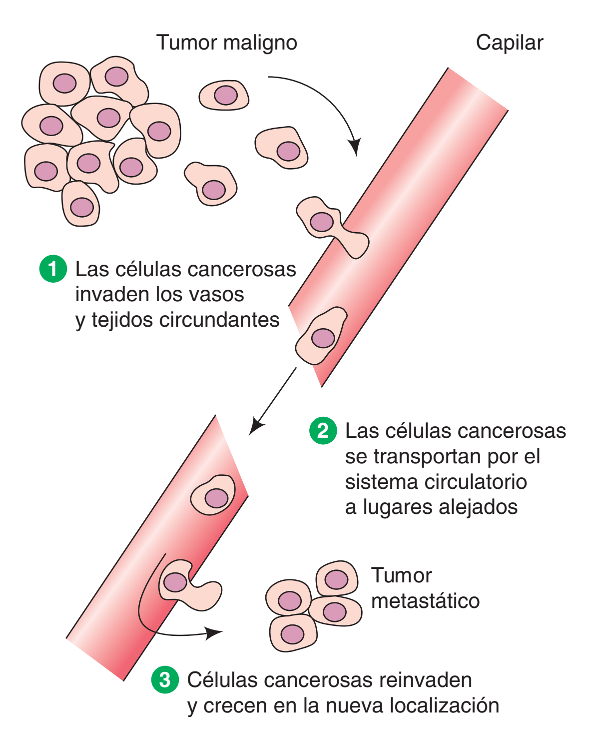


Figura 24.4 Etapas en el proceso de la metástasis. Sólo una pequeña fracción de las células de un cáncer típico realizan con éxito los tres pasos implicados en la metástasis: ① Invasión de los vasos y del tejido circundante. ② Transporte vía sistema circulatorio. ③ Reinvasión y crecimiento en un lugar alejado.

células separarse del tumor principal más fácilmente. Una molécula crucial, es la *E-cadherina* (página 540), una proteína de adhesión célula a célula cuya pérdida ha sido implicada en la reducida adhesividad de muchos cánceres epiteliales. Normalmente los cánceres altamente invasivos tienen menos E-cadherina que las células normales. Se ha demostrado que la reincorporación de la E-cadherina en células cancerosas aisladas, que carecen de esta molécula, inhibe su capacidad de formar tumores invasivos cuando las células se reinyectan en animales.

Una segunda característica que promueve el comportamiento invasivo es el aumento de la movilidad de las células cancerosas, que se estimula por las moléculas de señalización que se producen o bien por los tejidos hospedadores circundantes o bien por las propias células cancerosas. Además de activar la motilidad celular, algunas de estas moléculas de señalización funcionan como *quimioatractores* que guían el movimiento celular sirviendo como señales de atracción hacia las que migrarán las células cancerosas.

Otra característica que contribuye a la invasión es la capacidad de las células cancerosas de producir *proteasas* que degradan las estructuras que contienen proteínas, que de otra manera representarían barreras para el movimiento de las células cancerosas. Una barrera crítica que se encuentran la mayoría de los cánceres es la *lámina basal*, una densa capa de material que contiene proteínas y que separa las capas epiteliales de los tejidos subyacentes (*véase* Figura 17.8). Antes de que los cánceres epiteliales, que son el 90% de todos los tumores malignos humanos, puedan invadir tejidos adyacentes, debe romperse la lámina basal. Las células cancerosas atraviesan esta barrera produciendo y secretando proteasas para degradar las proteínas que forman el armazón de la lámina basal.

Una de tales proteasas es el *activador del plasminógeno*, una enzima que convierte el precursor inactivo *plasminógeno* en la proteasa activa *plasmina*. Dado que, en casi todos los tejidos el plasminógeno está presente en altas concentraciones, pequeñas cantidades del activador del plasminógeno liberadas por las células cancerosas pueden catalizar rápidamente la formación de grandes cantidades de plasmina. La plasmina lleva a cabo dos actividades: (1) Degrada componentes de la lámina basal y de la matriz extracelular, facilitando así la invasión tumoral, y (2) rompe precursores inactivos de las metaloproteinasas de la matriz, producidos fundamentalmente por las células hospedadoras circundantes, produciendo enzimas activas que también degradan componentes de la lámina basal y de la matriz extracelular. (Estas metaloproteinasas de la matriz fueron mencionadas antes en nuestra discusión sobre cómo las células endoteliales degradan la matriz extracelular durante la angiogénesis.)

Después de que las proteasas permiten a las células cancerosas atravesar la lámina basal, facilitan la migración de las células cancerosas degradando la matriz extracelular de

los tejidos subyacentes. Las células cancerosas migran hasta que alcanzan pequeños vasos sanguíneos o linfáticos, que también están rodeados por una lámina basal. Entonces las proteasas abren agujeros en esta segunda lámina basal permitiendo a las células cancerosas pasar a través de ella y a través de la capa de células endoteliales que forman el revestimiento interno de los vasos, punto en el que las células cancerosas han conseguido finalmente entrar en el sistema circulatorio.

Relativamente pocas células cancerosas sobreviven al viaje por el torrente circulatorio y establecen metástasis

Las células cancerosas que atraviesan las paredes de los pequeños vasos sanguíneos alcanzan la entrada directa al torrente sanguíneo, que transportará a las células a partes alejadas del cuerpo (Figura 24.4, paso ②). Cuando las células cancerosas inicialmente atraviesan las paredes de los vasos linfáticos, las células son transportadas primero a los ganglios linfáticos regionales donde podrían resultar alojadas y crecer. Por esta razón, los ganglios linfáticos regionales son una localización común de la diseminación inicial del cáncer. Sin embargo, los vasos linfáticos tienen numerosas interconexiones con los vasos sanguíneos, por lo que las células cancerosas que inicialmente entran en el sistema linfático finalmente llegan al torrente sanguíneo.

Independientemente de su ruta de entrada inicial, a menudo el resultado neto es un gran número de células cancerosas en el torrente sanguíneo. Incluso un pequeño tumor maligno que pese sólo unos pocos gramos, puede liberar varios millones de células cancerosas a la circulación cada día. Sin embargo, el torrente sanguíneo parece ser un lugar relativamente inhóspito ya que menos de una de cada mil células sobrevive al viaje hacia un potencial sitio de metástasis. ¿Son las pocas células que tienen éxito simplemente una representación aleatoria de la población original de células tumorales, o representan células que están especialmente dotadas para metastatizar? La Figura 24.5 ilustra un experimento diseñado para responder a esas preguntas. En este experimento se inyectaron células de melanoma de ratón en el torrente sanguíneo de ratones sanos para estudiar su capacidad para metastatizar. Pocas semanas después aparecieron metástasis en una variedad de localizaciones pero fundamentalmente en los pulmones. Las células de las metástasis pulmonares fueron extraídas e inyectadas en otro ratón lo que llevó a la producción de más metástasis pulmonares. Repitiendo el mismo procedimiento muchas veces se obtuvo finalmente una población de células cancerosas que formaban muchas más metástasis que la población de células tumorales originales.

La interpretación más directa es que el melanoma inicial consistía en una población heterogénea de células con diferentes propiedades, y que el aislamiento y reinyección repetitiva de las células derivadas de metástasis establecidas con éxito había seleccionado gradualmente aquellas células que estaban particularmente bien dotadas para metastatizar. Para probar esta hipótesis se han realizado más experimentos en los que se aislaron células individuales de un melanoma primario y cada célula aislada se cultivó para dar lugar a una población celular distinta. Tales poblaciones celulares, cada una de las cuales deriva de una célula inicial individual, se llaman **clones**. Cuando se inyectaron en animales, algunas de las células clonadas produjeron pocas metástasis, algunas produjeron numerosas metástasis y algunas produjeron cantidades intermedias. Puesto que cada clon derivaba de una célula diferente del tumor original, los resultados confirmaron que las células del tumor primario diferían en su habilidad para metastatizar.

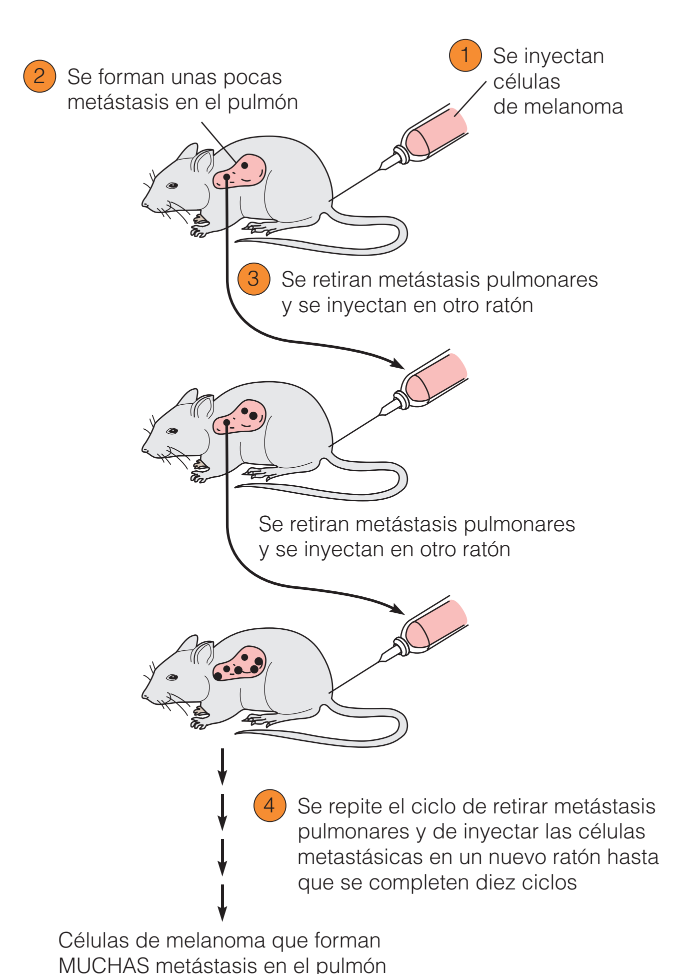


Figura 24.5 Selección de células de melanoma que muestran incrementada la habilidad de metastatizar. En este experimento, las células de melanoma de ratón fueron ① inyectadas en la vena de la cola del ratón. ② Después, un pequeño número de tumores metastáticos se desarrollaron en los pulmones, ③ las células de algunas de las metástasis del pulmón se retiraron y se inyectaron en otro ratón. ④ Cuando se repitió este ciclo diez veces, se observó que la población final de las células de melanoma producía muchas más metástasis de pulmón que la población celular original.

Patrones de flujo sanguíneo y factores órgano-específicos determinan dónde metastatizarán las células cancerosas

Algunas células cancerosas que circulan por el torrente sanguíneo salen finalmente a través de la pared de un vaso pequeño e invaden otro órgano, donde forman metástasis que se pueden localizar lejos del tumor inicial (Figura 24.4, paso ③). Aunque el torrente sanguíneo porta células cancerosas por todo el cuerpo, las metástasis tienden a desarrollarse de forma preferencial en ciertos sitios. Un factor responsable de esta especificidad está relacionado con los patrones de flujo sanguíneo. Basados únicamente en consideraciones de tamaño, las células cancerosas circulantes se alojan con más probabilidad en los capilares (pequeños vasos con un diámetro que no es superior a una única célula sanguínea). Después de alojarse en los capilares, las células cancerosas atraviesan las paredes de estos pequeños vasos, entran en los tejidos circundantes, e inician el desarrollo de nuevos tumores. Por ejemplo, consideremos los tumores primarios que se originan en la mayor parte de los órganos. Al entrar las células cancerosas en el torrente sanguíneo, el primer lecho capilar que se encontrarán estará en los pulmones. Como resultado, los pulmones son un lugar relativamente frecuente de metástasis para muchos tipos de cáncer. Sin embargo, los patrones de flujo sanguíneo no siempre se dirigen a los pulmones. Para los cánceres originados en el estómago y el colon, las células cancerosas que entran en el torrente sanguíneo son primero transportadas al hígado donde los vasos se dividen en un lecho capilar. Como resultado, el hígado es un sitio común de metástasis para esos cánceres.

Si bien los patrones de flujo sanguíneo son importantes, no siempre explican la distribución de las metástasis observadas. Ya en 1889, Stephen Paget propuso que las células cancerosas circulantes tenían una especial afinidad por el ambiente proporcionado por órganos particulares. La idea de Paget hace referencia a la hipótesis «semilla y suelo», basándose en la analogía de que cuando una planta produce semillas, éstas son arrastradas por el viento en todas las direcciones pero sólo crecen si caen sobre un suelo apropiado. De acuerdo con este punto de vista, las células cancerosas son transportadas por el torrente sanguíneo hacia una variedad de órganos, pero sólo unos pocos lugares proporcionan un ambiente óptimo de crecimiento para cada tipo celular. Se han obtenido pruebas a favor por un análisis sistemático de los lugares en que los cánceres tienden a metastatizar. En aproximadamente dos tercios de los cánceres examinados, las tasas de metástasis en los diferentes órganos pueden ser explicadas sólo por los patrones vasculares. En el resto de los casos, algunos cánceres metastatizan en órganos determinados menos frecuentemente de lo esperado y otros lo hacen más frecuentemente de lo esperado.

¿Por qué las células cancerosas crecen mejor en lugares determinados? Se cree que la respuesta implica interacciones entre las células cancerosas y moléculas específicas presentes en los órganos a los que son transportadas. Un ejemplo afecta al cáncer de próstata que comúnmente metastatiza al hueso (un patrón que no sería predecible basándose en los patrones vasculares). La razón para esta preferencia fue descubierta en experimentos en los que se mezclaron células cancerosas prostáticas con células de varios órganos —incluyendo hueso, pulmón y riñón— y las mezclas celulares se inyectaron entonces en animales. Se encontró que la capacidad de las células cancerosas prostáticas para desarrollar tumores es estimulada por la presencia de células derivadas del hueso, pero no por células derivadas del pulmón o del riñón. Estudios subsiguientes revelaron la explicación: las células óseas producen factores de crecimiento específicos que estimulan la proliferación de las células cancerosas prostáticas. Ésta es sólo uno de los diferentes tipos de interacciones moleculares que pueden influir en la capacidad de las células cancerosas para crecer en órganos determinados.

El sistema inmune puede inhibir el desarrollo de metástasis

¿Tiene el organismo algún mecanismo de defensa para protegerse contra el desarrollo de metástasis? Una posibilidad es el sistema inmune, que tiene la capacidad de atacar y destruir células extrañas. Cuando las células cancerosas circulan en el torrente sanguíneo, en el que viajan gran cantidad de células del sistema inmune, son especialmente vulnerables al ataque. Por supuesto, las células cancerosas no son literalmente de origen «extraño», pero a menudo, presentan cambios moleculares que podrían permitir al sistema inmune reconocerlas como células anormales.

Experimentos con animales sugieren que en algunos casos el ataque por el sistema inmunitario sí limita el proceso de metástasis. Uno de tales estudios, realizado por Michael Feldman y Lea Eisenbach, se realizó con dos líneas celulares de cáncer pulmonar murino: las células *D122* que metastatizan con mucha frecuencia y las células *A9* que metastatizan raramente. En general, la capacidad del sistema inmune para reconocer células como extrañas o anormales depende de la presencia de proteínas de la superficie celular denominadas moléculas del complejo **mayor de histocompatibilidad** (**MHC**, del ingles *major histocompatibility complex*) cuando Feldman y Eisenbach examinaron las moléculas MHC que portaban las dos líneas de células tumorales descubrieron una diferencia llamativa: las células A9 expresan dos tipos de MHC (llamados H-2K y H-2D), mientras que las células D122 expresan sólo uno (H-2D).

El descubrimiento de que las células D122 y A9 portan diferentes moléculas de superficie MHC plantea una pregunta importante: ¿Está relacionado el diferente comportamiento metastático de las dos tipos de células con la capacidad del sistema inmune de reconocerlas y atacarlas? Este asunto se investigó inyectando células A9 y D122 en grupos separados de animales y monitorizando la produc-

ción de **linfocitos T citotóxicos** (**CTLs**, del inglés, *cytotoxic T lymphocytes*), un tipo de células inmunes especializadas en el ataque de células extrañas y anormales. Se encontró que los animales producían numerosos CTLs dirigidos contra las células cancerosas A9, pero pocos CTLs dirigidos contra las células D122.

¿Por qué los CTLs atacan a las células A9 más fácilmente que a las células D122? La posibilidad más obvia es que el sistema inmune reconoce las moléculas MHC H-2K, que son expresadas por las células A9 pero no por las células D122. Se probó esta hipótesis introduciendo DNA purificado que contenía el gen H-2K en células D122 causando así que las células D122 produjeran la forma H-2K del MHC (Figura 24.6). Tal como se había predicho, las células D122 alteradas que expresaban H-2K mostraron una capacidad para metastatizar reducida cuando se inyectaron en ratones, lo que sugiere que la presencia de H-2K hizo a las células más susceptibles al ataque inmunitario. Sin embargo, el tumor primario en el lugar de la inyección creció normalmente, lo que implica que las células tumorales que intentan metastatizar a través del sistema circulatorio son más susceptibles al ataque inmunitario que las masas tumorales situadas fuera del torrente sanguíneo.

¿Qué causa el cáncer?

La proliferación incontrolada de las células cancerosas, combinada con su capacidad de metastatizar a lugares distantes, hace del cáncer una enfermedad que potencialmente amenaza la vida. ¿Qué causa la emergencia de células con tales propiedades destructivas? La gente a menudo ve el cáncer como una enfermedad misteriosa que golpea aleatoriamente y sin causa conocida, pero esta idea equivocada no considera los resultados de miles de investigaciones científicas, algunas de las cuales se realizaron hace más de 200 años. La conclusión ineludible que emerge de esos estudios es que los cánceres son causados fundamentalmente por agentes ambientales y factores ligados al estilo de vida, la mayoría de los cuales actúan provocando mutaciones en el DNA.

Los datos epidemiológicos han permitido identificar muchas causas de cáncer

La primera indicación de que un agente determinado puede causar cáncer, es proporcionada normalmente mediante un abordaje llamado *epidemiología*, la rama de la ciencia médica que investiga la frecuencia y distribución de las enfermedades en poblaciones humanas. Los estudios epidemiológicos han revelado que los cánceres se originan con diferentes frecuencias en distintas partes del mundo. Por ejemplo, el cáncer de estómago es frecuente en Japón, el cáncer de mama es importante en los Estados Unidos y el cáncer de hígado es común en África y el sudeste de Asia. Para determinar si son las diferencias de herencia o de ambiente las responsables de tales diferencias, los científicos han examinado las tasas de cáncer en la gente que se traslada de un país a otro. Por ejemplo, en Japón, la incidencia del cáncer de estómago es mayor y la incidencia de cáncer de colon es menor que en los Estados Unidos. Cuando las familias japonesas se trasladan a los Estados Unidos, sus tasas de cáncer están determinadas más por factores ambientales y de estilo de vida que por la herencia.

Los datos epidemiológicos han desempeñado un papel importante en la identificación de los factores ambientales que pueden causar cáncer. Las estadísticas más impactantes afectan al cáncer de pulmón, una enfermedad que ha aumentado unas diez veces su frecuencia en los Estados Unidos desde 1900 (Figura 24.7). Cuando se investigaron

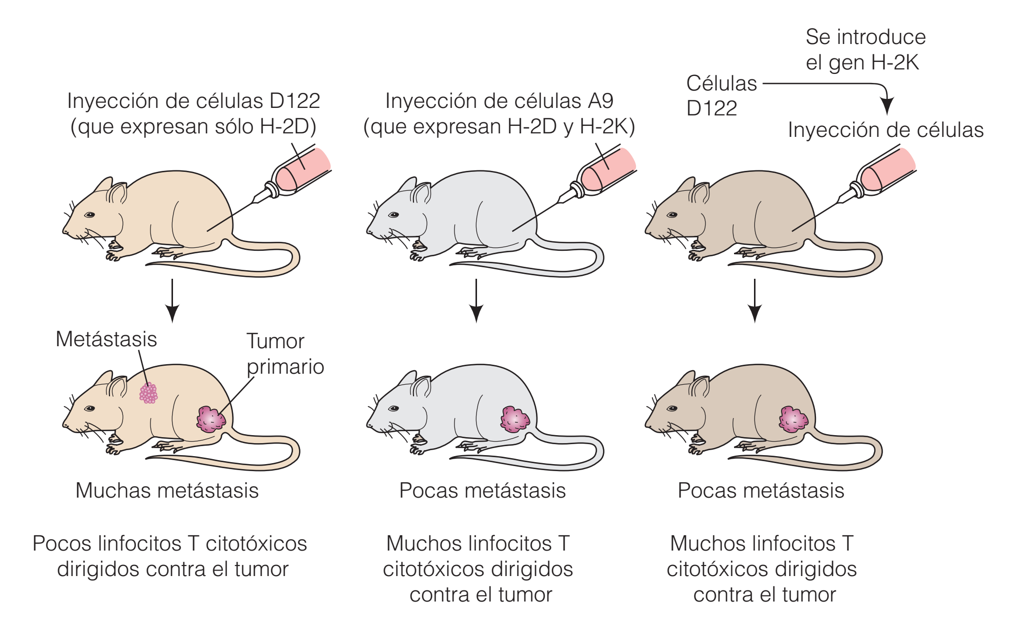


Figura 24.6 Efecto del reconocimiento inmune sobre la habilidad de las células cancerosas para metastatizar. *(Izquierda)* Las células de cáncer de pulmón D122, que expresan las moléculas de superficie H-2D, producen numerosas metástasis. *(Medio)* Las células cancerosas de pulmón A9 que expresan tanto moléculas H-2D como H-2K, metastatizan pobremente. *(Derecha)* Si el gen H-2K se introduce en las células D122, las células pierden su habilidad para metastatizar. Puesto que H-2K es una molécula de la superficie celular del MHC reconocida por el sistema inmune, estos estudios sugieren que el reconocimiento inmune influye en la capacidad de las células cancerosas de metastatizar.

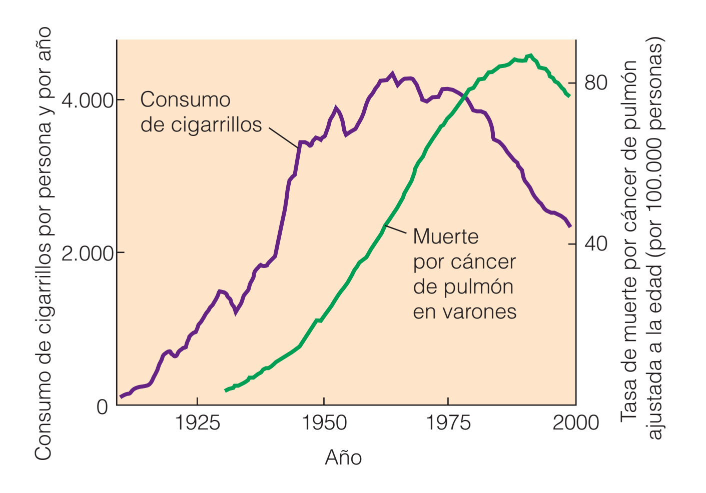
las causas posibles de esta epidemia de cáncer de pulmón, se descubrió que casi todos los pacientes de cáncer de pulmón compartían una característica: un historial de fumadores de cigarrillos. Como se esperaría si los cigarrillos fueran los responsables, los fumadores empedernidos desarrollaban cáncer de pulmón con más frecuencia que los fumadores ocasionales, y los que eran fumadores desde hacía un largo plazo de tiempo desarrollaban cáncer de pulmón más frecuentemente de lo que lo hacían los fumadores de corto plazo. Un lapso de tiempo de unos 25 años separaron el aumento observado en los tasas de cáncer de pulmón de los primeros aumentos en la tasa de fumadores, que es el tiempo típico requerido para el desarrollo de la mayoría de los cánceres humanos después de la exposición a un agente que causa cáncer.

Aunque la asociación entre fumar cigarrillos y el cáncer fue inicialmente descubierto a través de estudios epidemiológicos, las pruebas definitivas de una relación causa-efecto requieren evidencias experimentales directas. En el caso de los cigarrillos y el cáncer de pulmón tales evidencias proceden de estudios que mostraban que el humo de un cigarrillo contiene varias docenas de sustancias químicas que causan cáncer cuando se administran a animales.

A menudo muchas sustancias químicas pueden causar cáncer, después de una activación metabólica en el hígado

La idea de que ciertas sustancias químicas, tales como las que se encontraron en el humo del tabaco podían causar cáncer se propuso por primera vez hace más de 200 años. En 1761 un doctor londinense, John Hill, informó de que la gente que utilizaba de manera rutinaria rapé (una forma de tabaco en polvo, que se inhala) experimenta una elevada y anormal incidencia de cáncer nasal, sugiriendo la presencia en el tabaco de sustancias químicas que causan cáncer. Unos años más tarde, otro médico británico, Percival Pott, observó una elevada incidencia de cáncer de escroto entre los hombres que trabajan como deshollinadores en su juventud. Era una práctica común de la época emplear a chicos jóvenes para limpiar los conductos de la chimenea debido a que ellos entraban más fácilmente en los espacios estrechos que los adultos. Pott especuló con que el hollín de la chimenea se disolvía en los aceites naturales del escroto, irritaba la piel y finalmente desencadenaba el desarrollo del cáncer. Esta teoría condujo al descubrimiento de que el cáncer de escroto se podía prevenir entre los deshollinadores a través del uso de una prenda protectora y de la práctica del baño regular.

Desde estas pioneras observaciones, la lista de **carcinógenos** (sustancias que causan cáncer) conocidos y supuestos ha crecido hasta incluir cientos de sustancias químicas diferentes. Las sustancias químicas se etiquetan normalmente como carcinógenas debido a que humanos o animales desarrollan cáncer cuando se exponen a ellas. Sin embargo, esto no quiere decir que cada una de estas sustancias provoca cáncer a través de su propia acción directa. Por ejemplo, considere el comportamiento de *2-naftilamina*, un potente carcinógeno que causa cáncer de vejiga en el trabajador industrial y que está presente en el humo del tabaco. Como se podría esperar la alimentación de animales de laboratorio con 2-naftilamina induce una elevada incidencia de cáncer de vejiga. Pero si la 2-naftilamina se implanta directamente en la vejiga del animal, raramente se desarrolla el cáncer. La explicación de esta aparente discrepancia es que cuando 2-naftilamina se ingiere (por los ani-



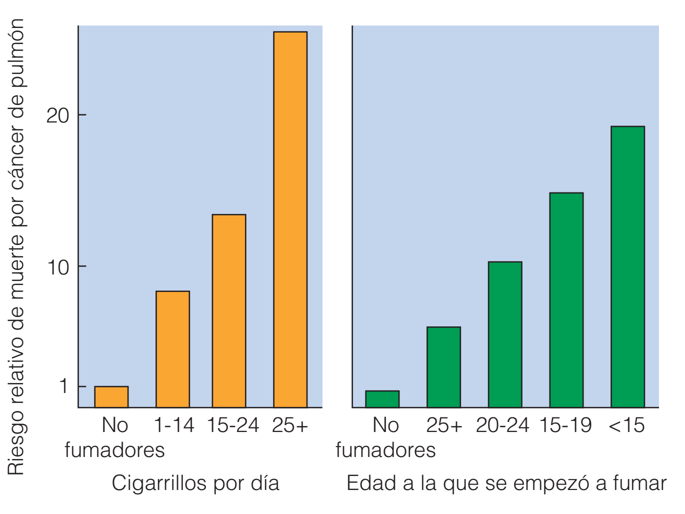


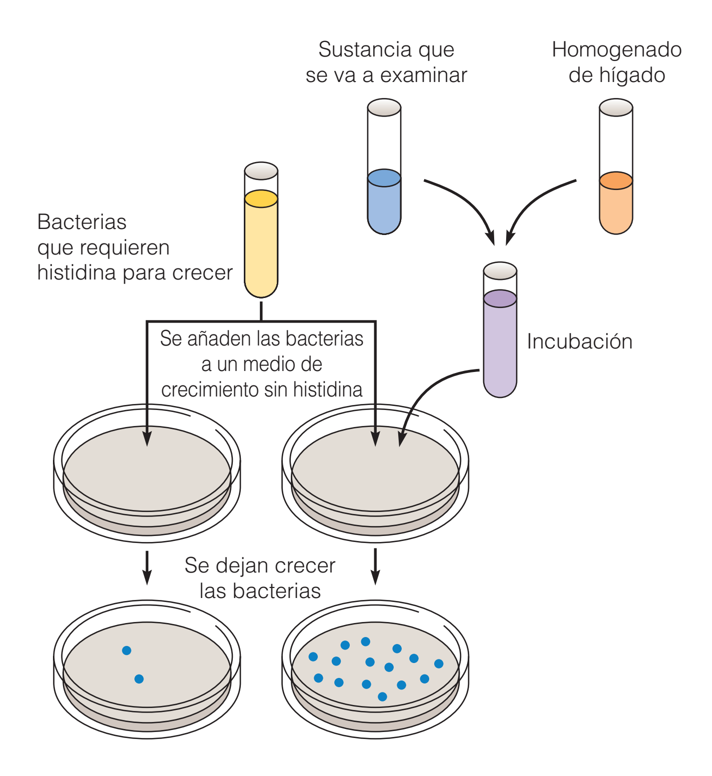
Figura 24.7 Fumar cigarrillos y cáncer de pulmón. El gráfico de la izquierda muestra que en los Estados Unidos el aumento del consumo de cigarrillos durante la primera mitad del siglo XX fue seguido de una explosión en el crecimiento de las muertes por cáncer de pulmón. Un lapso de tiempo de unos 25 años transcurrió entre el aumento de los índices de fumadores y el posterior aumento de las muertes por cáncer, que es el tiempo típico requerido para que la mayoría de los cánceres humanos se desarrollen después de la exposición a un agente que causa cáncer. Los histogramas de la derecha muestran que las tasas de cáncer de pulmón aumentan en función del número de cigarrillos fumados por día, y que los fumadores de larga duración desarrollan cáncer de pulmón con más frecuencia que los fumadores de corta duración.

males) o se inhala (por los humanos), pasa a través del hígado y se convierte metabólicamente en compuestos que son la verdadera causa del cáncer. Colocar la 2-naftilamina directamente en la vejiga del animal evita esta activación metabólica y en consecuencia el cáncer no surge.

Muchos carcinógenos comparten esta necesidad de la activación metabólica antes de que puedan causar cáncer. Las sustancias que muestran tal comportamiento, se denominan con más precisión **precarcinógenos**, un término que se aplica a cualquier sustancia química que es capaz de causar cáncer sólo despés de de que se haya activado metabólicamente. La activación de la mayoría de los precarcinógenos se realiza por proteínas del hígado que son miembros de la familia enzimática del citocromo P450. Los miembros de esta familia de enzimas catalizan la oxidación de las sustancias químicas extrañas ingeridas, tales como drogas y contaminantes, que hacen las moléculas menos tóxicas y más fáciles de excretar por el cuerpo. Sin embargo, en algunos casos estas reacciones de oxidación convierten de manera inadvertida sustancias químicas extrañas en carcinógenos, un fenómeno conocido como *activación del carcinógeno*.

Las mutaciones de DNA provocadas por carcinógenos químicos conducen al cáncer

Una vez que se había determinado que las sustancias químicas pueden causar cáncer, la cuestión que surgió es ¿cómo funcionan? La idea de que los carcinógenos químicos actúan provocando mutaciones en el DNA se propuso por primera vez alrededor de 1950 pero en ese momento había pocas evidencias que lo apoyaran ya que nadie había comparado de manera sistemática la potencia mutagénica de las diferentes sustancias químicas con su habilidad para causar cáncer. La necesidad de tal información inspiró a Bruce Ames para desarrollar una prueba de laboratorio rápida y sencilla para medir la actividad mutagénica de una sustancia química. El procedimiento que desarrolló denominado el **test de Ames**, utiliza bacterias como organismo prueba debido a que pueden crecer rápidamente en grandes cantidades en cultivo. Las bacterias utilizadas en el test de Ames es una cepa especial a la que le falta la capacidad de sintetizar el aminoácido *histidina*. Como se ilustra en la Figura 24.8, las bacterias se colocan



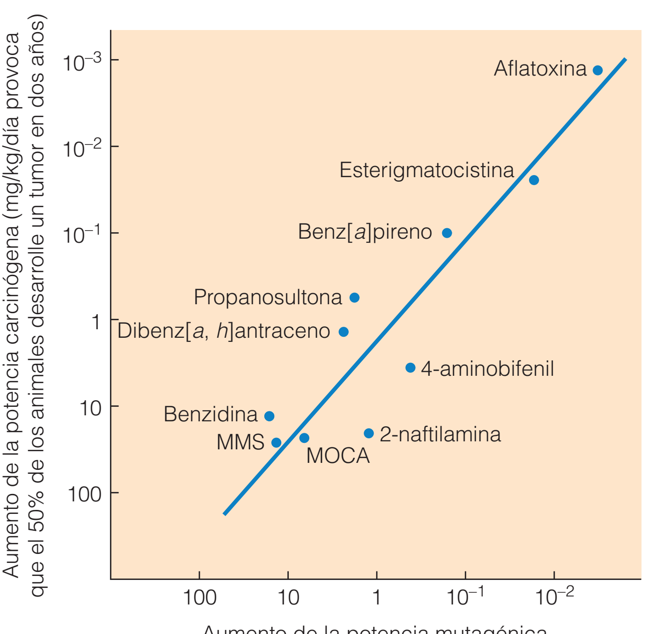


Figura 24.8 Test de Ames para identificar potenciales carcinógenos. El test de Ames está basado en la idea de que la mayoría de los carcinógenos son mutágenos. (*Arriba*) . La habilidad de las sustancias químicas para inducir mutaciones se mide en bacterias a las que les falta la capacidad para sintetizar el aminoácido histidina. Cuando se colocan un medio de cultivo que carece de histidina, las únicas bacterias que pueden crecer son las que han adquirido una mutación que les permite producir la histidina. El número de colonias bacterianas que crece está además relacionada con la potencia mutagénica de la sustancia que se está evaluando. Las sustancias químicas que se están investigando con el test de Ames se incuban primero con un homogenado hepático debido a que la mayoría de las sustancias químicas a las que los humanos se exponen sólo se convierten en carcinógenas después de que han sufrido una modificación bioquímica en el hígado (*Abajo*) Los datos del gráfico revelan que las sustancias que muestran una fuerte actividad mutagénica en el test de Ames también tienden a ser carcinógenos potentes. Entre este particular grupo de sustancias, la aflatoxina es el mutágeno y el carcinógeno más potente. (*Abreviaturas*: MOCA = 4-4′metilen-bis2-cloroanalina, MMS = metil metanosulfonato.)

en una placa de cultivo que contiene un medio de cultivo sin histidina, junto con la sustancia química para la que se quiere evaluar su actividad mutagénica. Normalmente las bacterias no crecerían en ausencia de histidina. Sin embargo, si la sustancia química que se está probando es mutagénica, provocará mutaciones al azar y alguna de ellas podría restablecer la capacidad de sintetizar histidina. Cada bacteria que adquiera esa mutación crecerá en una colonia visible, de forma que el número total de colonias es una medida de la potencia mutagénica de la sustancia que se está investigando.

Debido a que muchas sustancias químicas que causan cáncer sólo se convierten en carcinógenas después de que hayan sido modificadas por las enzimas hepáticas, el test de Ames incluye un paso en el que la sustancia química que se evalúa se incuba previamente con un extracto de células hepáticas para mimetizar las reacciones que normalmente ocurrirían en el hígado. La mezcla química resultante se evalúa entonces para detectar su capacidad para causar mutaciones bacterianas. Cuando el test de Ames se realiza de esta forma, se observa una fuerte correlación entre la capacidad de una sustancia química para causar mutaciones y su capacidad para causar cáncer.

El cáncer surge a través de un proceso multietapa que implica la iniciación, la promoción y la progresión de un tumor

Aunque la mutación desempeña un papel importante, el desarrollo del cáncer requiere múltiples etapas. Las primeras evidencias sobre este asunto procedían de estudios en los que se implicaba el comportamiento de los componentes del alquitrán de hulla, tales como el *dimetilbenzantraceno* (*DMBA*), en los animales de laboratorio. Alimentando a los ratones con una dosis única de DMBA raramente causa que un tumor se desarrolle. Sin embargo, si un ratón que se ha alimentado con una dosis única de DMBA se trata posteriormente con una sustancia que causa irritación de la piel, el cáncer se desarrollará en el área tratada (Figura 24.9). El irritante utilizado más frecuentemente para desencadenar la formación de tumores es una sustancia derivada de plantas denominada *aceite de crotón*, que está enriquecida en compuestos denominados *ésteres de forbol*. El aceite de crotón no causa cáncer en sí mismo, ni tampoco se produce el cáncer si el DMBA se administra *después* del aceite de crotón. Estas observaciones indican que el DMBA y el aceite de crotón desempeñan dos papeles diferentes, que se denominan **iniciación** y **promoción**. Durante la iniciación, las células normales se convierten al estado de precancerosas, y entonces la promoción estimula a las células alteradas a dividirse y formar tumores.

En el tipo de experimento precedente, puede pasar un año o más después de alimentar a los animales con una dosis única de DMBA y los tumores se desarrollarán si se irrita la piel del animal con aceite de crotón. Esto significa que un único tratamiento con DMBA creó un estado de inicio permanentemente alterado en las células localizadas por todo el cuerpo, y la posterior administración de aceite de crotón actuó en estas células alteradas promoviendo el desarrollo del tumor. La capacidad de las sustancias químicas de actuar como iniciadores se correlaciona con su capacidad para causar daños en el DNA, sugiriendo que el estado de inicio permanentemente alterado se basa en la mutación del DNA.

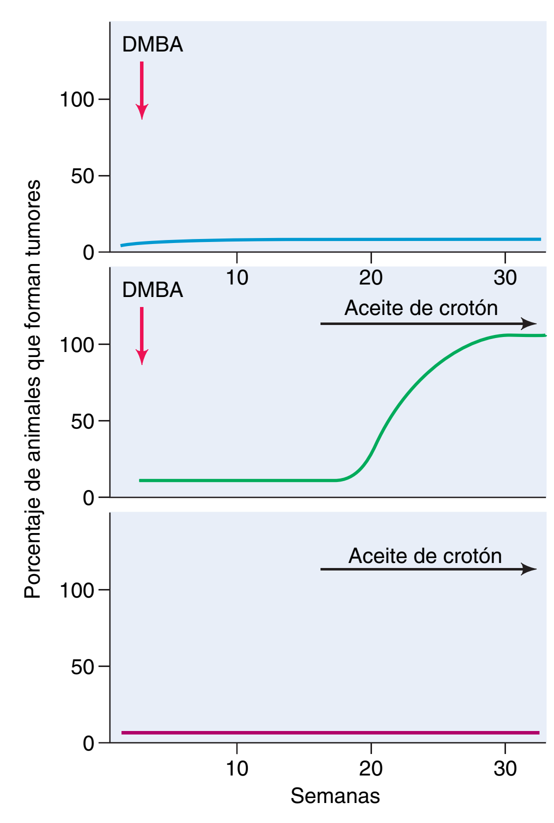


Figura 24.9 Evidencias de la existencia de las etapas de iniciación y de promoción durante el desarrollo del cáncer.
(Arriba) Los ratones tratados con una dosis única de DMBA (Dimetilbenz[*a*, *h*]antraceno) no forman tumores. *(Medio)* Si se pinta su piel con aceite de croton dos veces en semana después del tratamiento con DMBA, lleva a la aparición de cánceres de piel. Si la aplicación del aceite de crotón se paraliza unas pocas semanas durante el tratamiento (datos no mostrados), los tumores se reducen. *(Abajo)* El aceite de crotón por sí solo no produce cáncer de piel. Estos datos concuerdan con las conclusiones de que el DMBA es un iniciador y el aceite de crotón es un agente promotor.

En comparación, la promoción es un proceso gradual que requiere la exposición prolongada o repetida al agente promotor. La investigación de una amplia variedad de agentes promotores, tales como los ésteres de forbol del aceite de crotón, ha revelado que la principal propiedad compartida es la capacidad para estimular la proliferación celular. Cuando una célula que ha sufrido una mutación de iniciación se expone a un agente promotor, la célula es por ello estimulada para dividirse y el número de células mutadas aumenta. Como la proliferación continúa, la selección

natural tiende a favorecer a las células que exhiben tasas de crecimiento aumentadas y propiedades invasivas que conducen finalmente a la formación de un tumor maligno. El tiempo que se requiere para la promoción contribuye a prolongar el retraso que a menudo se produce entre la exposición a un carcinógeno iniciador y el desarrollo del cáncer.

La iniciación y la promoción van seguidas por una tercera etapa, conocida como la progresión del tumor (Figura 24.10). Durante la progresión del tumor, las propiedades de la célula tumoral cambian gradualmente a lo largo del tiempo a medida que las células adquieren rasgos más aberrantes y se convierten de forma creciente en agresivas. La fuerza que conduce la progresión del tumor es que las células muestran rasgos que le confieren una ventaja selectiva —por ejemplo, un aumento de la velocidad de crecimiento, aumenta la capacidad invasiva y la capacidad para sobrevivir en el torrente sanguíneo, la resistencia al ataque del sistema inmune, la capacidad para crecer en otros órganos, la resistencia a las drogas, la evasión de la apoptosis, y así sucesivamente— tendrán más éxito que las células a las que les faltan estas características y así gradualmente tienden a predominar.

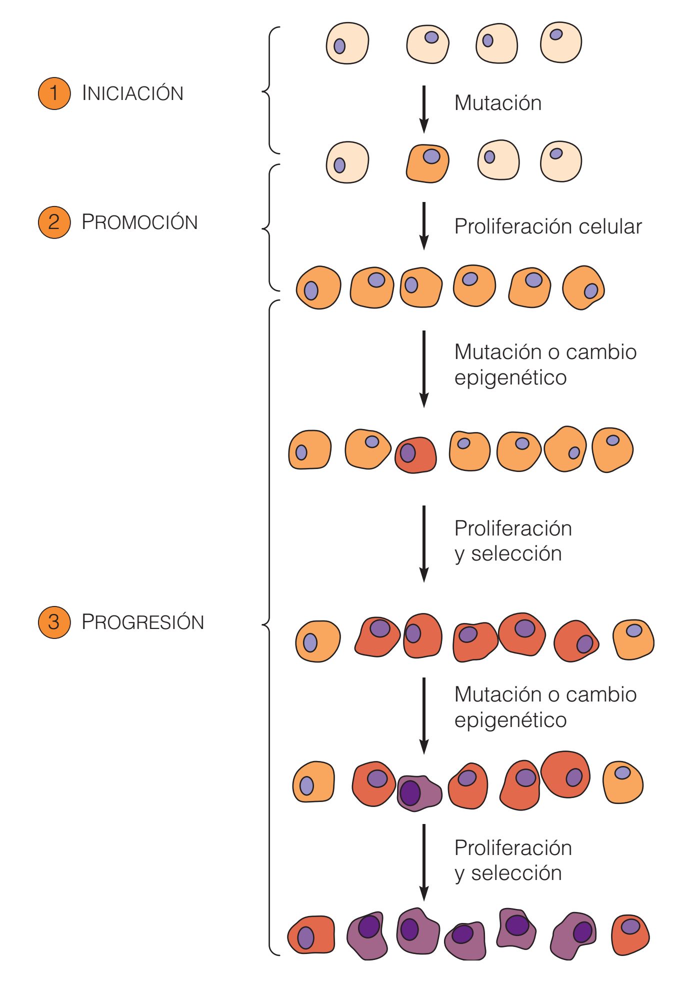


Figura 24.10 Principales etapas en el desarrollo del cáncer. El cáncer surge por un complejo proceso que implica tres etapas principales. ① La primera etapa, iniciación, basada en las mutaciones del DNA. Sigue por ② la etapa de promoción en donde la célula iniciada se estimula para que prolifere. ③ Durante la progresión del tumor, más mutaciones y cambios en la expresión de los genes crean variantes celulares que muestran tasas de crecimiento aumentadas u otras propiedades agresivas que les proporcionan a ciertas células una ventaja selectiva. Tales células tienden a ser más grandes que sus compañeras y se convierten en la población celular predominante en el tumor. Ciclos repetitivos de este proceso de selección crean una población de células cuyas propiedades cambian gradualmente con el paso del tiempo.

Mientras que es fácil ver por qué las células que muestran estas características tienden a prevalecer a través de la selección natural, esto no explica cómo se originaron los rasgos aberrantes en primer lugar. Una fuente de nuevos rasgos aberrantes son más mutaciones de DNA que se produjeron después de la mutación de iniciación original. Los nuevos rasgos pueden también aparecer a partir de cambios en la expresión de genes normales. El término **cambio epigenético** se utiliza cuando nos referimos a tales alteraciones en la expresión de un gen más que a un cambio en la estructura del gen en sí; en otras palabras, activando o inhibiendo la actividad de un gen normal sin mutarlo (en el Capítulo 23 se han descrito numerosos mecanismos para alterar la expresión de los genes). La progresión del tumor, se hace posible por una combinación de mutaciones de DNA y cambios epigenéticos, acompañados por la selección natural de aquellas células que adquieren propiedades ventajosas a través de estos mecanismos.

Las radiaciones ionizantes y ultravioletas también causan mutaciones del DNA que conducen al cáncer

Las sustancias químicas no son los únicos agentes que dañan el DNA que pueden causar cáncer. Poco después del descubrimiento de los rayos X por Wilhelm Roentgen en 1895 se anunció que la gente que trabajaba con este tipo de radiación desarrollaba cáncer a un ritmo anormalmente alto. Los estudios en animales confirmaron posteriormente que los rayos X crean mutaciones en el DNA y causan cáncer en proporción directa a la dosis administrada.

Un tipo similar de radiación se emite por muchos elementos radiactivos. Uno de los primeros ejemplos de los peligros carcinogénicos provocados por la radiactividad ocurrió en 1920 en una factoría de New Jersey que producía esferas de reloj que brillan en la oscuridad. Para pintar las esferas se utilizaba una pintura luminiscente que contenía el elemento radiactivo radio, y esta pintura se aplicaba con un cepillo de punta fina que los trabajadores con frecuencia humedecían con sus lenguas. El resultado era que inadvertidamente se ingerían pequeñas cantidades de radio que se concentraban en sus huesos, conduciendo al desarrollo de cáncer de huesos.

También se han observado elevadas tasas de cáncer causadas por la exposición a la radiactividad en personas

expuestas a la lluvia radiactiva de las explosiones nucleares. Los incidentes más dramáticos ocurrieron en las ciudades japonesas de Hiroshima y Nagasaki después de que allí se dejaran caer bombas atómicas en 1945. Otro incidente ocurrió en el área que rodeaba la central nuclear de Chernobyl en la antigua Unión Soviética (ahora Ucrania) que explotó en 1986.

Los rayos X y formas relacionadas de radiación emitida por elementos radiactivos, se denominan **radiaciones ionizantes** debido a que retiran electrones de las moléculas, generando así iones altamente reactivos que provocan daños en el DNA. La **radiación ultravioleta (UV)** es otro tipo de radiación que causa cáncer dañando el DNA. La capacidad de la radiación ultravioleta de los rayos de sol de causar cáncer se dedujo por primera vez a partir de las observaciones de que el cáncer de piel es más prevalente en personas que pasan muchas horas al sol, especialmente en regiones tropicales donde la luz del sol es más intensa. La radiación UV se absorbe principalmente por la piel donde transmite la suficiente energía como para desencadenar la formación de los *dímeros de pirimidina*; esto es, la formación de enlaces covalentes en el DNA entre bases de pirimidinas adyacentes, como se muestra en la Figura 19.17c. Si el daño no se repara, la distorsión de la doble hélice causa un emparejamiento de bases inapropiado durante la replicación del DNA que conduce a distintos patrones de mutación. Por ejemplo, una mutación CC⟶TT (conversión de dos citosinas adyacentes en dos timinas) es un producto único de la exposición UV y puede por tanto usarse como una «firma» distintiva para identificar a las mutaciones causadas por la luz del sol.

La existencia de tales mutaciones «firma» proporciona una forma de probar que las mutaciones inducidas por la luz UV causan cáncer de piel. Uno de posprimeros genes estudiados fue el gen *p53* (página 648) que se sabe que está mutado en muchos cánceres humanos. Cuando el gen *p53* de las células cancerosas de la piel se examinó utilizando técnicas de secuenciación de DNA, se observaron con frecuencia las mutaciones firma distintivas de la luz UV (tales como CC⟶TT). Por el contrario, cuando se detectaron mutaciones de *p53* en otros tipos de cáncer, no mostraron la firma de la luz UV (Figura 24.11).

Tales observaciones confirman que las mutaciones de *p53* observadas en las células cancerosas de la piel se desencadenan por la luz del sol, pero no prueban que estas mutaciones causen realmente que surja el cáncer. ¿Es posible que las mutaciones sean un subproducto irrelevante y aleatorio de la exposición durante largos periodos a la luz del sol? Esta cuestión se ha resuelto examinando la distribución precisa de las mutaciones inducidas por la luz UV en el gen *p53*. En el Capítulo 21 se indicó que los cambios en la tercera base de un codón a menudo no alteran el aminoácido específico para ese codón (*véase* Figura 21.8). Si las mutaciones de *p53* detectadas en los cánceres de piel son simplemente un subproducto aleatorio de la exposición a la luz del sol, entonces las mutaciones en la tercera base de un codón que no cambian un aminoácido deberían ser tan frecuentes como las mutaciones en la primera o en la segunda base que sí cambian un aminoácido. De hecho, la secuenciación del DNA ha revelado que las mutaciones de *p53* vistas en las células cancerosas de piel no están distribuidas al azar. En vez de eso, implican de manera preferente cambios de bases que alteran aminoácidos de la proteína *p53*, como se esperaría si estas mutaciones estuvieran implicadas en el mecanismo por el que la luz del sol causa cáncer.

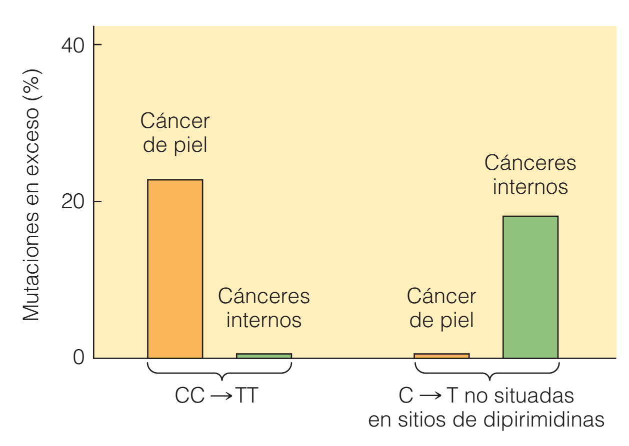


Figura 24.11 Incidencia de los dos tipos de mutaciones de *p53* en el cáncer de piel y en los cánceres internos. Las dos barras de la izquierda representan la frecuencia de mutaciones CC⟶TT, que se desencadenan por la radiación UV. Las dos barras de la derecha representan la frecuencia de las mutaciones C⟶T no situadas en sitios de dipirimidinas, que no están causadas por la radiación UV. Fíjese en que el tipo de mutación desencadenada por la radiación UV se encuentra en el gen *p53* en los cánceres de piel (carcinoma de células escamosas) pero no en los cánceres de órganos internos. Las frecuencias de mutación se han representado con respecto a lo que se esperaría que ocurriese al azar.

Los virus y otros agentes infecciosos son responsables de algunos cánceres

Aunque las propiedades de las sustancias químicas y de las radiaciones que causan cáncer se conocieron a principios de 1900, la posibilidad de que los agentes infecciosos pudieran también causar cáncer no ha sido ampliamente valorada, debido a que el cáncer generalmente no se comporta como una enfermedad contagiosa. Sin embargo, en 1911 Peyton Rous realizó experimentos con pollos enfermos aportados por los granjeros locales que demostraron por primera vez que el cáncer puede ser causado por un virus. Estos pollos tenían cánceres cuyo origen estaba en el tejido conjuntivo o *sarcomas*. Para investigar el origen de los tumores, Rous trituró el tejido tumoral y lo pasó a través de un filtro cuyos poros eran tan pequeños que ni tan siquiera las bacterias podían pasar a través de ellos. Cuando inyectó el extracto limpio, libre de células en pollos sanos, éstos también desarrollaron sarcomas. Puesto que no se

habían inyectado células cancerosas en los pollos sanos, Rous concluyó que los sarcomas se podían transmitir por un agente infeccioso que era más pequeño que una bacteria. Ésta era la primera vez que alguien había demostrado la existencia de un **virus oncogénico**, es decir, un virus que puede causar cáncer.

Inicialemente, las conclusiones de Rous se acogieron con escepticismo. Finalmente fue en 1966, cuando un Rous de 87 años recibió el Premio Nobel, ¡más de 50 años después del descubrimiento del primer virus del cáncer! Ahora está claro que en animales docenas de virus causan cáncer y que un número menor causan cáncer en humanos. El primer ejemplo en humanos se descubrió por Denis Burkitt, un cirujano británico que trabajaba en África a finales de la década de 1950. En determinadas épocas del año, Burkitt se fijaba que un gran número de sus pacientes jóvenes desarrollaban cánceres linfocíticos masivos en el cuello y en la mandíbula. Debido a que este tipo de cáncer, ahora conocido como **linfoma de Burkitt**, se producía en epidemias periódicas localizadas en regiones geográficas específicas, Burkitt propuso que se transmitía por un agente infeccioso.

Las ideas de Burkitt pronto atrajeron la atención de dos virólogos, llamados Epstein y Barr, cuyos estudios de microscopía electrónica revelaron partículas de virus en las células del linfoma de Burkitt. Ahora el virus se denomina el **virus Epstein-Barr** o **EBV** en reconocimiento a estos científicos. A diferencia de los virus que causan cáncer en los animales, es difícil probar que un virus como el EBV causa cáncer en humanos debido a que las consideraciones éticas impiden evaluar directamente la hipótesis inyectando el virus en individuos sanos. Sin embargo, algunas evidencias indirectas apoyan la conclusión de que el EBV causa el linfoma de Burkitt: (1) las secuencias de DNA y las proteínas codificadas por el EBV se detectaban en células tumorales obtenidas de pacientes con linfoma de Burkitt, pero no en células normales procedentes de los mismos individuos; (2) si se añadía EBV purificado a cultivos de linfocitos humanos normales causaba que las células adquirieran propiedades de células cancerosas; (3) y al inyectar EBV en monos inducía la formación de linfomas.

Siguiendo al descubrimiento del EBV, se han identificado varios virus adicionales como las causas de cáncer en humanos. Entre éstos se cuentan los virus de la *hepatitis B* y de la *hepatitis C*, que causan cáncer hepático y el *papilomavirus humano* (*HPV*), que causa cáncer cervical. Además de los virus, la bacteria *Helicobacter pylori (H. pylori)* causa cáncer de estómago y las infecciones parasitarias por lombrices planas se han ligado a un pequeño número de cánceres de vejiga y de conductos biliares.

Los agentes infecciosos desencadenan el desarrollo del cáncer de dos maneras fundamentales. Una implica a estos agentes —tales como el virus de la hepatitis B y de la hepatitis C, a *H. pylori* y a las lombrices planas parásitas— que causan destrucción del tejido e inflamación crónica. Tal destrucción crea unas condiciones de inflamación crónica en donde las células del sistema inmune infiltran el tejido e intentan matar al agente infeccioso y reparan el tejido dañado. Desafortunadamente, los mecanismos que utilizan las células del sistema inmune para luchar contra las infecciones a menudo producen sustancias químicas mutagénicas, tales como los *radicales libres* del oxígeno (formas del oxígeno altamente reactivas que contienen un electrón desapareado). Esto significa que la proliferación de las células de sustitución para el tejido dañado, tiene lugar en condiciones en las que el daño al DNA está probablemente aumentando, de este modo la probabilidad de que el cáncer causado por mutaciones aparezca.

La otra forma en la que los agentes infecciosos causan cáncer está relacionada con la capacidad de ciertos virus para estimular directamente la proliferación de células infectadas. El mecanismo por el cual esto se consigue varía dependiendo del virus. En algunos casos, implica a genes virales que causan cáncer, mientras que en otros casos, un virus altera el comportamiento de los genes de la célula hospedadora. Los tipos de genes implicados en tales acontecimientos desempeñan un papel no sólo en los cánceres virales sino también en los cánceres causados tanto por sustancias químicas como por radiaciones. Pasaremos por tanto a tratar los genes relacionados con el cáncer y la manera en la que operan.

Oncogenes y genes supresores de tumores

Un gran conjunto de pruebas apuntan al papel desempeñado por las mutaciones del DNA en el desarrollo del cáncer. Como hemos visto, algunos cánceres causados por mutaciones se desencadenan por sustancias químicas o por radiaciones, y algunos son causados por agentes infecciosos. Otros simplemente representan mutaciones espontáneas, errores de replicación del DNA, o en algunos casos mutaciones heredadas. Pero a pesar de estas diferencias en su origen, el resultado final es siempre la mutación de genes implicados en controlar la proliferación celular. Ahora describiremos las dos clases principales de genes afectados: *oncogenes* y *genes supresores de tumores*.

Los oncogenes son genes cuya presencia puede desencadenar la formación de tumores

Un **oncogén**, es un gen cuya *presencia* puede desencadenar el desarrollo del cáncer. Algunos oncogenes se introducen en las células por virus que causan cáncer, mientras que otros surgen por la mutación de genes celulares normales. En cualquier caso, los oncogenes codifican proteínas que estimulan la proliferación celular excesiva y/o promueven la supervivencia celular.

El primer oncogén que se descubrió fue en el virus del sarcoma de Rous. Puesto que este virus tiene sólo 4 genes, es relativamente fácil determinar qué gen desencadena el desarrollo del cáncer. Los estudios mutacionales revelaron que los defectos en un gen en particular, denominado el encogen *src,* producía virus mutantes que ya no producían cáncer pero que todavía podían infectar a las células y reproducirse con normalidad. En otras palabras una copia funcional del gen *src* debe estar presente antes de que el virus pueda provocar cáncer. Abordajes similares condujeron a identificar varias docenas de otros oncogenes virales.

En los cánceres no causados por virus, las primeras evidencias de la existencia de oncogenes procedían de estudios en donde el DNA aislado a partir de células cancerosas de vejiga humana se introdujo en una cepa de células murinas en cultivo denominadas células 3T3. El DNA se administró en condiciones que estimulaban la **transfección** —es decir, la captación del DNA extraño por las células y su incorporación en sus cromosomas—. Cuando se transfectó con el DNA de las células cancerosas, algunas de las células 3T3 murinas proliferaron excesivamente; cuando estas células se reinyectaron en los ratones, los animales desarrollaron cáncer. Además, los científicos sospecharon que un gen humano captado por las células murinas había causado el cáncer. Para confirmar las sospechas, se aplicaron técnicas de clonaje de genes al DNA aislado a partir de las células cancerosas murinas. El resultado fue la identificación del primer oncogén humano: un gen RAS mutante que codifica para una forma anormal de Ras, la proteína cuyo papel en la señalización del crecimiento se describió en los Capítulos 14 y 19. (Fíjese en que los nombres de los genes humanos —como por ejemplo, «*RAS*»— generalmente se escriben en letras mayúsculas y en itálica, mientras que los nombres de las proteínas que producen —por ejemplo, Ras— se escriben sin itálica y a menudo sólo con la letra inicial en mayúsculas.)

RAS fue solamente el primero de las docenas de oncogenes humanos que se descubrieron. Mientras que estos oncogenes se definían como genes que causan cáncer, normalmente un único oncogén no es suficiente. Por ejemplo, en los experimentos de transfección descritos en el párrafo anterior, la introducción del oncogén RAS provocaba cáncer sólo porque las células 3T3 de ratón utilizadas en estos estudios ya tenían una mutación en otro gen que controlaba el ciclo celular. Si se usan células normales de ratón aisladas en fresco, en vez de las células 3T3 y se introduce el oncogén RAS, por sí mismo no produce cáncer. Esta observación ilustra un principio importante: normalmente se requieren mutaciones múltiples para convertir una célula normal en una célula cancerosa.

Los proto-oncogenes se convierten en oncogenes por varios mecanismos distintos

¿Cómo adquieren los cánceres humanos oncogenes si la mayoría de los cuales no está causado por virus? La respuesta es que los oncogenes surgen por mutación de genes celulares normales denominadas **proto-oncogenes**. A pesar de ese nombre que suena a dañino, los proto-oncogenes no son genes malos que están simplemente esperando una oportunidad para fomentar el desarrollo del cáncer. Más bien, son genes celulares normales que realizan contribuciones esenciales a la regulación del crecimiento celular y la supervivencia. El término proto-oncogén simplemente supone que si y cuando la estructura y actividad de un proto-oncogén se altera por varias clases de mutaciones, la forma mutante del gen puede causar cáncer. Las mutaciones que convierten a los proto-oncogenes en oncogenes se crean a través de varios mecanismos distintos, que están ilustrados en la Figura 24.12 y que brevemente se describen abajo.

1. **Mutaciones puntuales.** El mecanismo más sencillo para convertir a un proto-oncogén en un oncogén es una *mutación puntual*, es decir, la sustitución de un único nucleótido en el DNA que causa la sustitución de un único aminoácido en la proteína codificada por el proto-oncogén normal. Los oncogenes de este tipo que se encuentran con mayor frecuencia son los oncogenes RAS que codifican formas anormales de la proteína Ras. Las mutaciones puntuales crean formas anormales, hiperactivas de la proteína Ras, que provocan que la ruta de Ras esté continuamente activada, conduciendo de esta forma a una proliferación celular excesiva. Los oncogenes RAS se han detectado en varios cánceres humanos, incluyendo a los de la vejiga, pulmón, colon, páncreas y tiroides. Una mutación puntual en cualquiera de los sitios diferentes del oncogén *RAS* y el sitio particular implicado parece estar influenciado por el carcinógeno que lo causó.
2. **Amplificación génica.** El segundo mecanismo para crear oncogenes utiliza la amplificación de los genes (página 796) para aumentar el número de copias de un proto-oncogen. Cuando el número de copias génicas aumenta, provoca que la proteína codificada por el proto-oncogén se produzca en cantidades excesivas, aunque la proteína en sí misma es normal. Por ejemplo, alrededor del 25% de los cánceres humanos de mama y de ovario, han amplificado copias del gen *ERBB2*, que codifica para un receptor de un factor de crecimiento. La existencia de múltiples copias del gen conduce a la producción de demasiada proteína receptora, que, a cambio, desencadena una proliferación celular excesiva.
3. **Traslocación cromosómica.** Durante la *traslocación cromosómica*, una porción de un cromosoma se quita físicamente y se liga a otro cromosoma. Un ejemplo clásico es el que sucede en el linfoma de Burkitt, un tipo de cáncer asociado con el virus de Epstein-Barr (EBV). La infección con el EBV estimula la proliferación celular pero no es suficiente

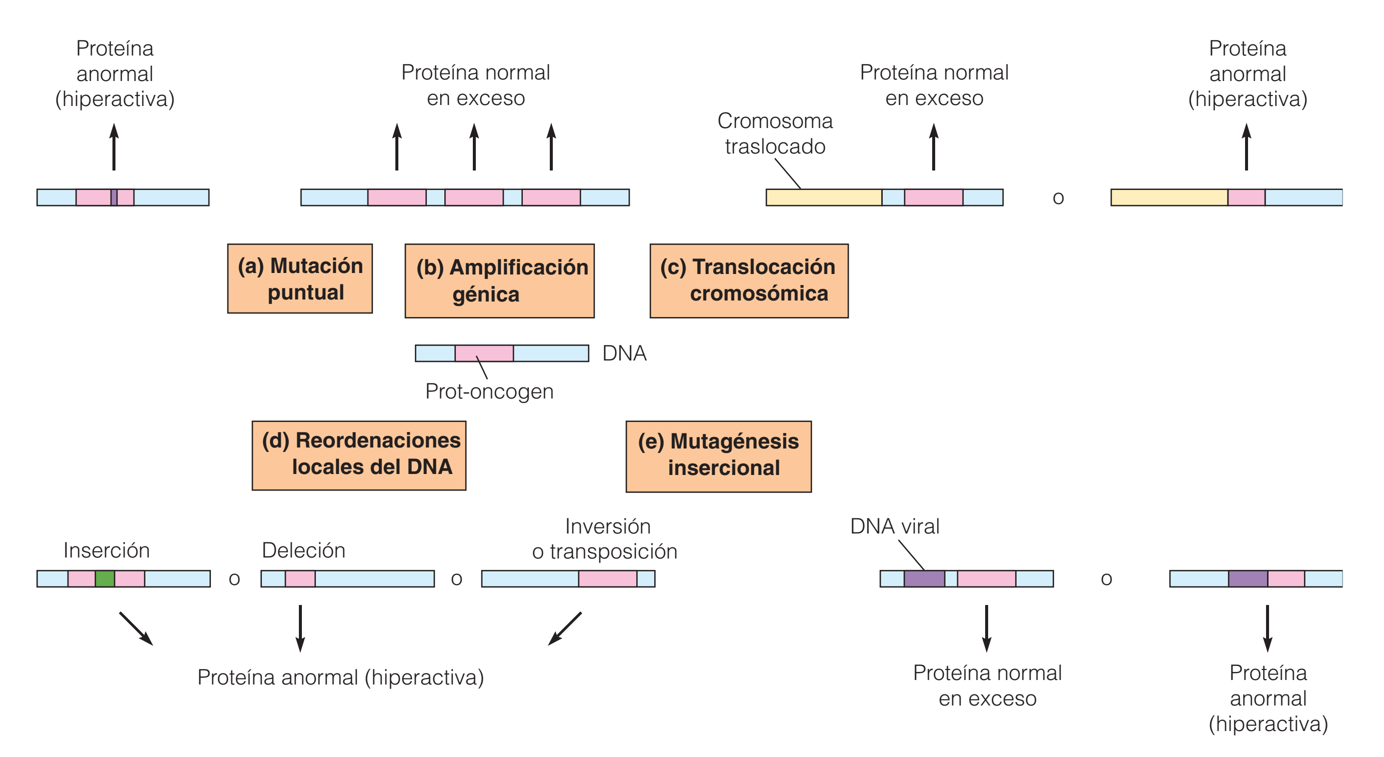


Figura 24.12 **Mecanismo para convertir proto-oncogenes en oncogenes.** Algunos de los oncogenes producidos por estos mecanismos codifican proteínas anormales, mientras que otros producen proteínas normales en cantidades excesivas. (**a**) Una mutación puntual implica la sustitución de un único nucleótido que crea un oncogén que codifica una proteína anormal que difiere en un único aminoácido de la proteína normal producida por el proto-oncogén. (**b**) La amplificación génica crea múltiples copias génicas que se expresan de forma activa produciendo de esta forma cantidades excesivas de la proteína normal. (**c**) Las traslocaciones cromosómicas trasladan segmentos de cromosomas de un cromosoma a otro. Esto puede o fundir dos genes para formar un oncogén que codifique una proteína anormal o puede colocar a un proto-oncogén cerca de un gen muy activo, induciendo así una mayor actividad en el proto-oncogén traslocado. (**d**) Las reordenaciones locales del DNA (tales como inserciones, deleciones, inversiones y transposiciones) pueden alterar la estructura de los proto-oncogenes y causar que produzcan proteínas anormales. (**e**) La mutagénesis insercional se desencadena por la integración de DNA viral en un cromosoma huésped cercano a un proto-oncogen. Esto puede o bien alterar al proto-oncogen, creando así un oncogén que codifique una proteína anormal o bien aumentar la expresión del proto-oncogén y causar así que produzca mucha proteína.

como para causar cáncer por sí misma. La enfermedad sólo aparece cuando se produce una traslocación que afecta al cromosoma 8 en una de estas células en proliferación. En las traslocaciones más frecuentes, un proto-oncogén denominado *MYC* se traslada del cromosoma 8 al cromosoma 14, en donde queda situado cercano a una región del cromosoma 14 sumamente activa que tiene genes que codifican moléculas de anticuerpo (Figura 24.13). El traslado del gen *MYC* a un lugar tan cercano a esos genes de anticuerpo de elevada actividad provoca que el gen *MYC* también sea activado, conduciendo así a una superproducción de la proteína Myc, un factor de transcripción que estimula la proliferación celular. Aunque el gen Myc traslocado retiene su estructura normal y codifica una proteína Myc normal es todavía un oncogén debido a que su nueva localización en el cromosoma 14 provoca la sobreexpresión del gen.

Las traslocaciones también pueden alterar la estructura del gen y causar la producción de proteínas anormales. Un ejemplo que implica al *Cromosoma Filadelfia*, una versión anormal del cromosoma 22 asociada comúnmente con una leucemia mielógena crónica. El cromosoma Filadelfia se crea por un corte del DNA cercano a los extremos de los cromosomas 9 y 22, seguido de un intercambio de DNA recíproco entre los dos cromosomas. Esta traslocación crea un oncogén denominado *BCR-ABL*, que contiene secuencias de DNA derivadas de los dos genes diferentes (*BCR* y *ABL*). El resultado es que el oncogén produce una *proteína de fusión* que funciona de manera anormal debido a que contiene secuencias de aminoácidos derivadas de las dos proteínas diferentes.

4. **Reordenaciones locales del DNA.** Otro mecanismo para crear oncogenes implica reordenaciones locales en donde las secuencias de bases de los proto-oncogenes se alteran por *delecciones*, *inserciones*, *inversiones* (eliminación de una secuencia seguida de una reinserción en la dirección opuesta) o *transposicio-*

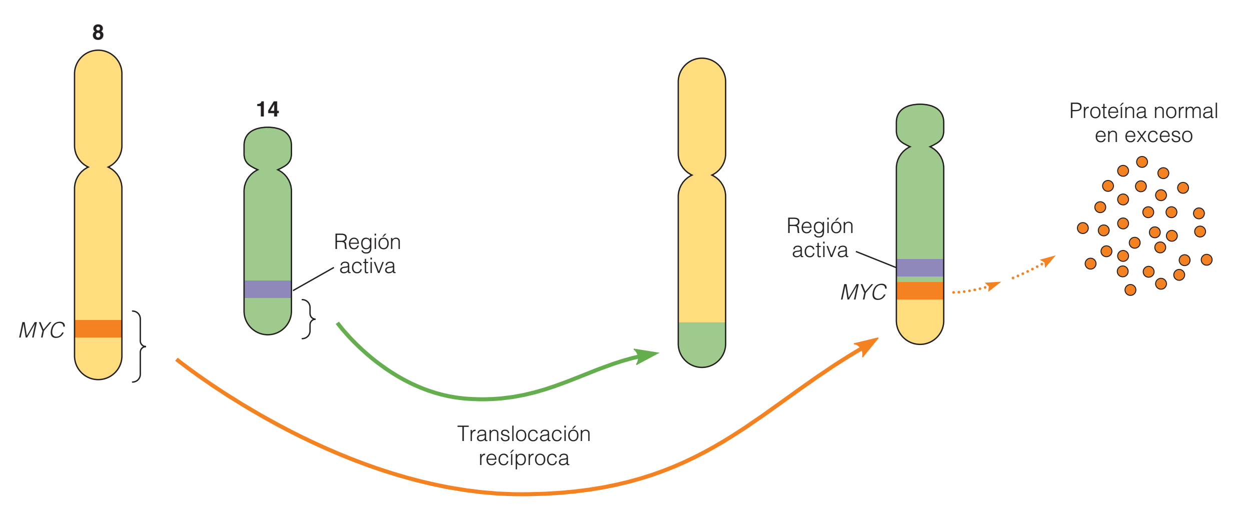


Figura 24.13 Traslocación cromosómica en el linfoma de Burkitt. En los linfocitos que dan lugar al linfoma de Burkitt, un segmento del cromosoma 8 que contiene el gen *MYC* normal se intercambia con frecuencia con un segmento del cromosoma 14. Esta traslocación recíproca coloca al gen *MYC* normal adyacente a una región muy activa del cromosoma 14, que contiene genes que codifican moléculas de anticuerpo. El traslado del gen *MYC* tan cerca de los genes de anticuerpos, tan activos, provoca que el gen *MYC* también se active. Esta activación conduce a una superproducción de la proteína Myc que estimula la proliferación celular.

nes (movimiento de una secuencia de un sitio a otro). Un ejemplo que se ha encontrado en los cánceres de tiroides y en los de colon ilustran cómo una simple reordenación puede crear un oncogén a partir de dos genes normales. Este ejemplo implica a dos genes, denominados *NTRK1* y *TPM3* que residen en el mismo cromosoma. *NTRK1* codifica un receptor tirosina quinasa y *TPM3* codifica una proteína sin ningún parentesco, que es la tropomiosina no muscular. En algunos cánceres, se produce una inversión del DNA que provoca que un extremo del gen TPM3 se fusione con el extremo opuesto del gen NTRK1 (Figura 24.14). El gen resultante, denominado oncogén TRK, produce una proteína de fusión que contiene el sitio tirosina kinasa del receptor ligado a una región de la molécula de tropomiosina que forma *espirales enrolladas* (página 490) que son estructuras que provocan que las cadenas de polipéptidos se reúnan en dímeros. El resultado es que la proteína de fusión forma un dímero permanente y su tirosina quinasa está permanentemente activada. (Recuerde del Capítulo 14, que los receptores tirosina quinasa normalmente están activados si mantienen juntas dos moléculas de receptor para formar un dímero.)

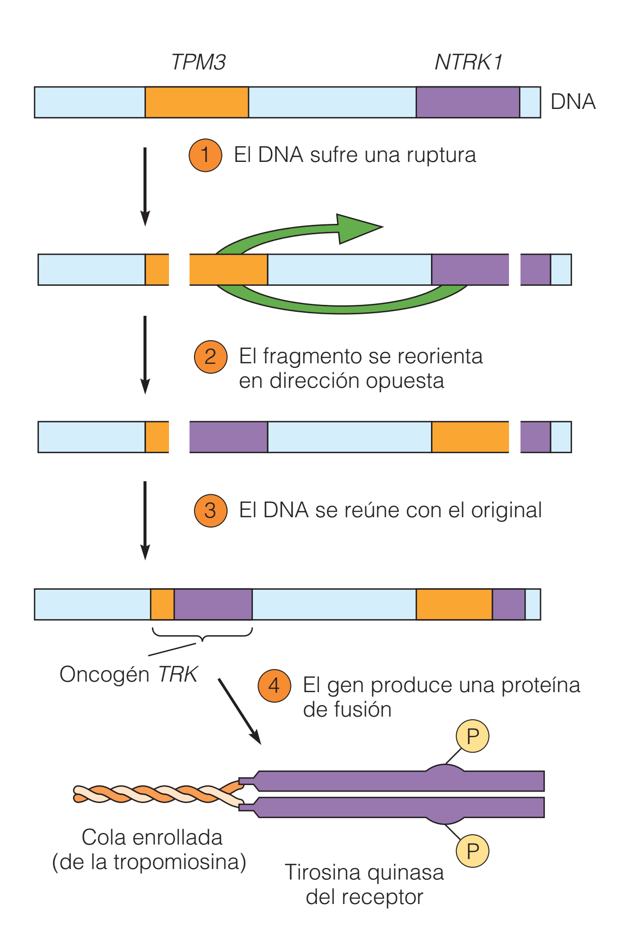


Figura 24.14 Origen del oncogén *TRK*. El oncogén *TRK* se crea por una inversión cromosómica que reúne segmentos de dos genes que residen en el mismo cromosoma. Uno de estos genes (*NTRK1*) codifica un receptor de un factor de crecimiento que muestra actividad tirosina quinasa, y el otro (*TPM3*) codifica una tropomiosina no muscular. ① Ruptura del DNA cromosómico dentro de los genes *NTRK1* y *TPM3* genera un fragmento de DNA que se ② reorienta en dirección opuesta y ③ se reúne con el DNA original. Esta inversión causa que un extremo del gen TPM3 se fusione con el extremo opuesto del gen *NTRK1*, creando así un oncogén *TRK*. ④ El oncogén *TRK* produce una proteína de fusión en donde el segmento de tropomiosina causa que la región del receptor forme un dímero activando de forma permanente su sitio tirosina quinasa.

5. **Mutagénesis insercional.** Los retrovirus que no poseen sus propios oncogenes a veces pueden causar cáncer integrando sus genes en un cromosoma huésped en una región en donde se localice un proto-oncogén huésped. En tales casos, la integración del DNA viral, convierte al proto-oncogén en un oncogén o bien porque altera la estructura del gen provocando la producción de una proteína anormal o bien provocando la sobreexpresión del gen. Este fenómeno denominado **mutagénesis insercional**, se encuentra con frecuencia en cánceres animales pero en raras ocasiones en cánceres humanos. Sin embargo, algunos cánceres humanos se pueden crear de esta forma de manera inadvertida en pruebas de terapia génica que utilizan retrovirus como vectores para reparar genes defectuosos (página 702).

La mayoría de los oncogenes codifican componentes de rutas de señalización de crecimiento

Acabamos de ver que las alteraciones en los proto-oncogenes pueden convertirlos en oncogenes, quienes a cambio codifican proteínas que o son estructuralmente anormales o se producen en cantidades excesivas. ¿Cómo producen cáncer estas proteínas que codifican los oncogenes? Aunque hasta la fecha se han identificado más de 100 oncogenes diferentes, la mayoría de las proteínas que producen encajan en una de estas seis categorías: *factores de crecimiento*, *receptores*, *proteínas de unión a GTP de la membrana plasmática*, *proteínas quinasas no receptoras*, *factores de transcripción y reguladores del ciclo celular o de la muerte celular* (Tabla 24.1). Estas seis categorías están todas relacionadas con etapas en las rutas de señalización del crecimiento (por ejemplo, ver las seis etapas en la ruta de Ras

Tabla 24.1 Algunos ejemplos de oncogenes que se agrupan por la función proteica

Nombre del oncogén	Proteína producida	Origen del oncogén	Tipo de cáncer más frecuente*
1. Factores de crecimiento			
v-sis	PDGF	Viral	Sarcomas (monos)
COL1A1-PDGFB	PDGF	Translocación	Fibrosarcoma
2. Receptores			
v-erb-b	Receptor de EGF	Viral	Leucemia (pollos)
TRK	Receptor del factor de crecimiento nervioso	Reordenaciones del DNA	Tiroides
ERBB2	Receptor ErbB2	Amplificación	Mama
v-mpl	Receptor de trombopoyetina	Viral	Leucemia (ratones)
3. Proteínas de unión al GTP de la membrana plasmática			
KRAS	Ras	Mutación puntual	Páncreas, colon, pulmón, otros
HRAS	Ras	Mutación puntual	Vejiga
NRAS	Ras	Mutación puntual	Leucemias
4. Proteínas quinasas no receptoras			
BRAF	Raf quinasa	Mutación puntual	Melanoma
v-src	Src quinasa	Viral	Sarcomas (pollos)
SRC	Src quinasa	Reordenaciones del DNA	Colon
TEL-JAK2	Jak quinasa	Traslocación	Leucemias
BCR-ABL	Abl quinasa	Traslocación	Leucemia mielógena crónica
5. Factores de transcripción			
MYC	Myc	Traslocación	Linfoma de Burkitt
MYCL	Myc	Amplificación	Cáncer de pulmón de células pequeñas
c-myc	Myc	Mutagénesis insercional	Leucemia (pollos)
v-jun	Jun	Viral	Sarcomas (pollos)
v-fos	Fos	Viral	Hueso (ratones)
6. Reguladores del diclo celular o de la muerte celular			
CYCD1	Ciclina	Amplificación, traslocación	Mama, linforma
CDK4	Cdk	Amplificación	Sarcoma, glioblastoma
BCL2	Bcl-2	Traslocación	Linfoma no de Hodgkins

* Los cánceres, si no se especifica otra cosa, son en humanos. Sólo se han puesto en la lista los tipos de cánceres más frecuentes.

ilustradas en la Figura 19.41). Las secciones siguientes proporcionan un ejemplo de cómo las proteínas producidas por los oncogenes de cada uno de los seis grupos pueden contribuir al desarrollo del cáncer.

1. **Factores de crecimiento**. Normalmente las células no se dividirán si no han sido previamente estimuladas por un factor de crecimiento apropiado. Pero si una célula posee un oncogén que produce tal factor de crecimiento, la célula puede estimular su propia proliferación. Un oncogén que funciona de esta forma es el gen *v-sis* («*v*» significa *viral*) que se encuentra en el *virus del sarcoma del simio* que provoca cáncer en monos. El oncogén *v-sis* codifica una forma mutante del *factor de crecimiento derivado de plaquetas* (*PDGF*). Cuando el virus infecta a una célula de mono cuyo crecimiento está normalmente controlado por PDGF, el PDGF producido por el oncogén v-sis continuamente estimula la proliferación de la propia célula (en contraste con la situación normal en la que las células sólo están expuestas al PDGF cuando se libera por plaquetas sanguíneas circundantes).

   En algunos sarcomas humanos, también se ha detectado un oncogén relacionado con el PDGF. Estos tumores poseen una traslocación cromosómica que crea un gen en donde parte del gen de PDGF se une a parte de un gen no relacionado (el gen que codifica el colágeno). El oncogén resultante produce PDGF de forma incontrolada, causando así que las células que contienen el gen continuamente estimulen su propia proliferación.

2. **Receptores**. Varias docenas de oncogenes codifican receptores implicados en rutas de señalización de crecimiento. Como se ha descrito en el Capítulo 14, muchos receptores muestran actividad tirosina quinasa intrínseca activada sólo cuando un factor de crecimiento se une al receptor. Los oncogenes a veces codifican versiones mutadas de tales receptores cuya actividad tirosina quinasa está permanentemente activada, independientemente de la presencia o ausencia de un factor de crecimiento. El oncogén *TRK*, que se ha descrito en la sección de los reordenamientos del DNA, es un ejemplo (Figura 24.14). Otro ejemplo es el oncogén *v-erb b* que se encontró en un virus que causa un cáncer de glóbulos rojos en pollos. El oncogén *v-erb b* produce una versión alterada del receptor del *factor de crecimiento epidérmico* (*EGF*) que retiene la actividad tirosina quinasa pero al que le falta el sitio de unión del EGF. Como consecuencia de esto, el receptor está permanentemente activado, es decir, muestra actividad tirosina quinasa incluso en ausencia de EGF (Figura 24.15), mientras que la forma normal del receptor sólo muestra actividad tirosina quinasa cuando se une a EGF.

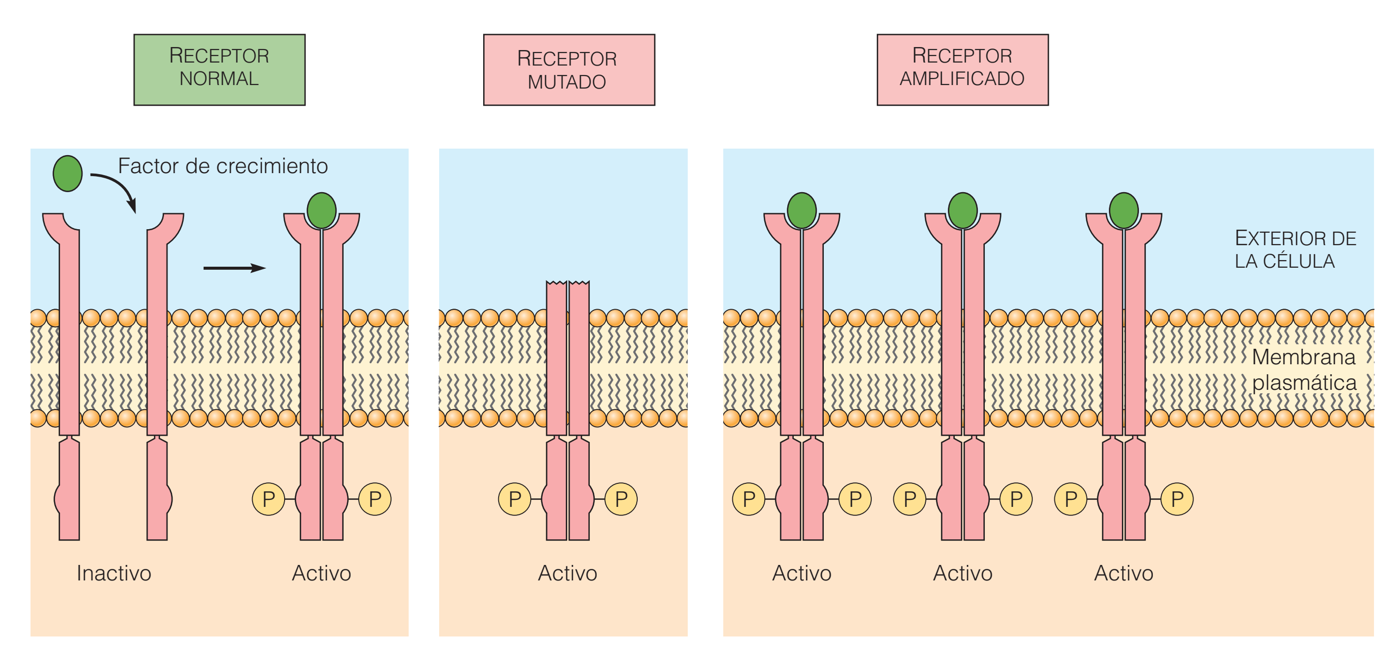


Figura 24.15 Receptor tirosina quinasa en células normales y cancerosas. (*Izquierda*) Durante la activación normal del receptor, la unión de un factor de crecimiento a su receptor promueve el agrupamiento de dos moléculas de receptor, provocando así que la actividad tirosina quinasa de cada receptor catalice la fosforilación del receptor adyacente (autofosforilación). (*Medio*) Algunos oncogenes codifican receptores mutantes cuya tirosina quinasa está permanentemente activa. La ilustración muestra un receptor mutante que ha perdido su sitio de unión a un factor de crecimiento. Esto hace que el receptor esté activo permanentemente, es decir, muestre actividad tirosina quinasa incluso en ausencia de factor de crecimiento. (*Derecha*) Otros oncogenes producen receptores anormales pero en cantidades excesivas, lo que también conduce a una actividad excesiva del receptor.

Otros oncogenes producen receptores normales pero en cantidades excesivas, lo que conduce a una señalización del crecimiento hiperactiva (Figura 24.15, *derecha*). Un ejemplo viene proporcionado por el gen humano *ERBB2*. Como se trató anteriormente en el Capítulo, la amplificación del gen *ERBB2* en ciertos cánceres de mama y de ovario causa que produzca en exceso un receptor de un factor de crecimiento. La presencia de demasiadas moléculas de receptor provoca una respuesta al factor de crecimiento magnificada y, por tanto, una proliferación celular excesiva.

Algunas de las rutas de señalización del crecimiento, tales como la vía Jak-STAT descrita en el Capítulo 23, utilizan receptores que no poseen actividad proteína quinasa. Con tales receptores, la unión del factor de crecimiento causa que el receptor activado estimule la actividad de una molécula de tirosina quinasa independiente. Un ejemplo de un oncogén que codifica para tal tipo de receptor se produce en el *virus de la leucemia mieloproliferativa* que provoca leucemia en los ratones. El oncogén, denominado *v-mpl*, codifica una versión mutada del receptor para *trombopoyetina*, un factor de crecimiento que utiliza la vía Jak-STAT para estimular la producción de plaquetas en la sangre.

3. **Proteínas de la membrana plasmática que se unen a GTP.** En muchas rutas de señalización del crecimiento, la unión de un factor de crecimiento a su receptor conduce a la activación de una proteína de unión a GTP de la membrana plasmática llamada Ras (página 448). Los oncogenes que codifican proteínas Ras mutadas son el tipo de oncogenes más comúnmente detectados en cánceres humanos. Normalmente, las mutaciones puntuales que crean los oncogenes *RAS* provocan que un único aminoácido incorrecto se inserte en una de las tres posibles localizaciones de la proteína Ras. El resultado neto es una proteína Ras hiperactiva que mantiene unido GTP en vez de degradarlo a GDP, manteniendo así a la proteína en un permanente estado de activación. En este estado hiperactivo, la proteína Ras envía continuamente una señal estimuladora del crecimiento al resto de la vía Ras, independientemente de si los factores de crecimiento se unen a los receptores celulares de factores de crecimiento.

4. **Proteínas quinasas no receptoras.** Una característica común compartida por muchas rutas de señalización del crecimiento es el uso de reacciones de fosforilación de proteínas para transmitir señales al interior celular. Las enzimas que catalizan estas reacciones de fosforilación intracelular se conocen como proteínas **quinasas no receptoras** para diferenciarlas de las proteínas quinasas intrínsecas a los receptores de la superficie celular. Por ejemplo, en el caso de la ruta Ras, la proteína Ras activada desencadena una cascada de reacciones de fosforilación proteíca intracelulares que comienzan con la fosforilación de la proteína Raf quinasa y que conducen finalmente a la fosforilación de MAP quinasas (*véase* Figura 19.41, paso ④). Varios oncogenes codifican proteínas quinasas implicadas en esta cascada. Un ejemplo es el oncogén humano BRAF, que codifica para una proteína Raf mutada en variedad de cánceres diferentes. También se han identificado los oncogenes que codifican proteínas quinasas no receptoras implicadas en otras rutas de señalización. Incluidos en este grupo están los oncogenes que producen versiones anormales de las proteínas quinasas Src, Jak y Abl.

5. **Factores de transcripción.** Algunas de las proteínas quinasas no receptoras activadas en las rutas de señalización de crecimiento posteriormente desencadenan cambios en los factores de transcripción, alterando así la expresión de los genes. En una gran variedad de cánceres, se han detectado los oncogenes que producen formas mutantes o cantidades excesivas de varios factores de transcripción. Entre los más comunes se encuentran los oncogenes que codifican los factores de transcripción Myc, que controlan la expresión de numerosos genes implicados en la proliferación y supervivencia celular. Por ejemplo, ya hemos visto, cómo las traslocaciones cromosómicas asociadas al linfoma de Burkitt crean un oncogén *MYC* que produce cantidades excesivas de la proteína Myc (Figura 24.13). El linfoma de Burkitt es sólo uno de los diferentes cánceres humanos en donde la proteína Myc se produce en exceso. Normalmente en estos otros cánceres, la amplificación génica es más responsable que la traslocación cromosómica. Por ejemplo, con frecuencia se observa la amplificación del gen *MYC* en los cánceres de pulmón de células pequeñas y en menor medida, en una amplia gama de otros carcinomas, incluyendo del 20 al 30% de los cánceres de mama y de ovario.

6. **Reguladores del ciclo celular o de la muerte celular.** En la etapa final de las vías de señalización del crecimiento, los factores de transcripción activan la expresión de los genes que codifican proteínas implicadas en la proliferación celular. Los genes activados incluyen los que codifican *ciclinas* y *quinasas dependientes de ciclinas (Cdks)*, cuyo papel en el desencadenamiento del paso a través de puntos de control en el ciclo celular se describieron el Capítulo 19. Varios oncogenes humanos producen proteínas de este tipo. Por ejemplo, un gen llamado *CDK4* de una quinasa dependiente de ciclinas, se amplifica en algunos sarcomas, y el gen de ciclinas *CYCD1* se amplifica comúnmente en los cánceres de mama y se

altera por traslocación cromosómica en algunos linfomas. Tales oncogenes producen cantidades excesivas de versiones de complejos de Cdk-ciclinas, que estimularán posteriormente la progresión a través del ciclo celular (incluso en ausencia de factores de crecimiento).

En unos pocos casos, los oncogenes contribuyen a la acumulación de células en división inhibiendo la muerte celular más que estimulando directamente la proliferación celular. Un ejemplo implica al gen que codifica a la proteína inhibidora de la apoptosis Bcl-2 (Figura 14.26). En ciertos tipos de linfomas se observan traslocaciones cromosómicas que implican a este gen. El efecto neto de estas traslocaciones es una producción excesiva de Bcl-2 que inhibe la apoptosis y que además fomenta la acumulación de células en división.

La mayoría de los oncogenes codifican una proteína que se incluye en una de las seis categorías precedentes. Algunos de estos oncogenes producen cantidades anormales, versiones hiperactivas de tales proteínas; otros oncogenes producen cantidades excesivas de una proteína que de otra forma sería normal. En cada caso, el resultado neto es una proteína que estimula la acumulación incontrolada de células en división.

Los genes supresores de tumores son genes cuya inactivación o pérdida pueden conducir al cáncer

Al contrario que los oncogenes, cuya *presencia* puede inducir la formación de cáncer, la pérdida o *inactivación* de los **genes supresores de tumores** puede también conducir al cáncer. Como el nombre insinúa, la función normal de tales genes es contener la proliferación celular. En otras palabras, los genes supresores de tumores actúan como frenos en el proceso de la proliferación celular, mientras que los oncogenes funcionan como aceleradores de la proliferación celular. De los aproximadamente 30.000 genes de las células humanas, sólo unas pocas docenas muestran las propiedades de los supresores de tumores. Puesto que la pérdida de la función de sólo uno de estos genes puede causar cáncer, cada uno debe realizar una función extraordinariamente importante.

La primera indicación de que las células contienen genes cuya pérdida puede conducir al cáncer vino de experimentos sobre fusión celular en donde células normales se fusionaban con células cancerosas. Basándonos en nuestros conocimientos actuales sobre oncogenes, podríamos esperar que las células híbridas creadas por la fusión de células cancerosas con células normales hubieran adquirido oncogenes a partir de la célula cancerosa original y por tanto mostraría un crecimiento incontrolado, igual que una célula cancerosa. De hecho, no es esto lo que pasa. La fusión de las células cancerosas con las células normales casi siempre produce células híbridas que se comportan como el parental normal y no forman tumores (Figura 24.16). Tales resultados, publicados por primera vez al final de la década de 1960, proporcionaron las primeras evidencias de que las células normales contienen genes que pueden suprimir el crecimiento de los tumores y restablecer el comportamiento de crecimiento normal.

Aunque las células cancerosas fusionadas con células normales generalmente producen células híbridas a las que les falta la capacidad de formar tumores, esto no significa que estas células sean normales. Cuando se les permite crecer en cultivo por largos periodos de tiempo, a menudo las células híbridas revierten el comportamiento maligno e incontrolado de las células cancerosas originales. La reversión del comportamiento maligno está asociada con la pérdida de ciertos cromosomas, sugiriendo que estos cromosomas en particular contienen genes que habían estado suprimiendo la habilidad de formar tumores. Tales observaciones finalmente condujeron al nombramiento de los genes perdidos como «genes supresores de tumores».

Mientras las células híbridas retengan ambos juegos de los cromosomas originales —es decir, cromosomas derivados de ambos, células cancerosas y células normales— la capacidad para formar tumores se suprime. La supresión de tumores se observa incluso cuando las células del cáncer

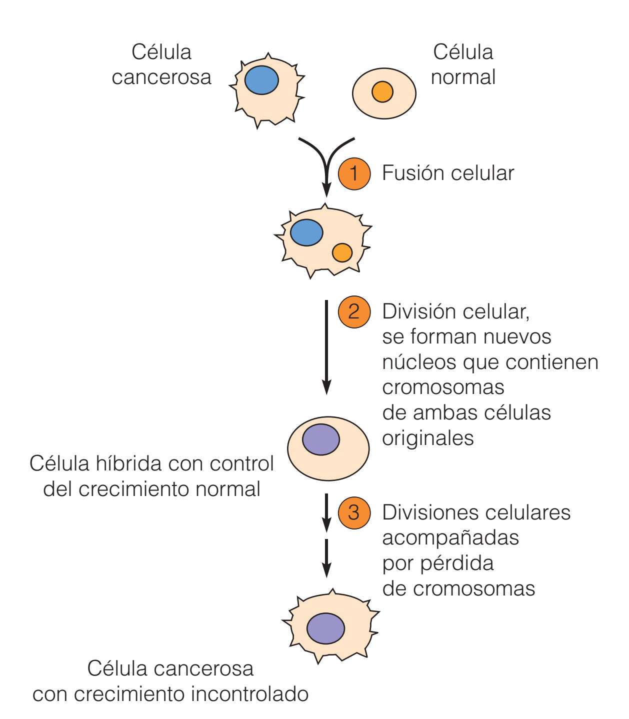


Figura 24.16 Fusión de células cancerosas con células normales. Cuando las células cancerosas se fusionan con las células normales, inicialmente las células híbridas resultantes no forman tumores: normalmente, después de proliferar en cultivo durante largos periodos de tiempo, las células híbridas revierten el comportamiento incontrolado, y de formación de tumores de las células cancerosas originales. Esta reversión se acompaña por la pérdida de cromosomas que contienen genes supresores de tumores.

original poseen un oncogén como el gen mutante RAS, que se expresa activamente en las células híbridas. Esto significa que los genes supresores de tumores localizados en los cromosomas de las células normales pueden sortear los efectos de un oncogén RAS presente en el cromosoma de una célula cancerosa. La capacidad para formar tumores sólo reaparece después de que la célula híbrida pierda un cromosoma que contenga un gen supresor de tumores crítico.

Aunque los experimentos de fusión celular proporcionaron las evidencias iniciales de la existencia de los genes supresores de tumores, identificar estos genes no es una tarea sencilla. Por definición, la existencia de un gen supresor de tumores sólo se hace evidente después de que se ha perdido su función. ¿Cómo van los científicos a averiguar algo cuya existencia se desconoce hasta que desaparece? Un abordaje implica a familias que tienen un riesgo elevado de padecer cáncer. Mientras que de la mayoría de los cánceres se sabe que se desencadenan por el entorno, aproximadamente del 10 al 20% de los casos de cáncer se asocian a defectos genéticos heredados. Cuando se dice que tales cánceres son hereditarios, esto no significa que la gente normalmente herede el cáncer de sus padres. Lo que se puede heredar, sin embargo, es una mayor *susceptibilidad* a desarrollar cáncer. Normalmente, la razón para que aumente el riesgo es un defecto heredado en un gen supresor de tumores. Puesto que los genes supresores de tumores son entidades cuya pérdida de función se asocia con el cáncer, habitualmente se requieren dos mutaciones sucesivas —una en cada copia del gen que porta cada cromosoma homólogo—. Las posibilidades de que estas dos mutaciones ocurran al azar en las dos copias del mismo gen son muy pequeñas. Sin embargo, si la persona hereda una versión mutada (o perdida) de un gen supresor de tumores de un parental, tiene mucho más riesgo de desarrollar un cáncer debido a que se necesita sólo una mutación (en la segunda copia de ese gen supresor de tumores) en una sola célula para provocar el cáncer (Figura 24.17). En la siguiente sección, veremos cómo el estudio de la susceptibilidad a heredar un cáncer ha facilitado la identificación de genes supresores de tumores.

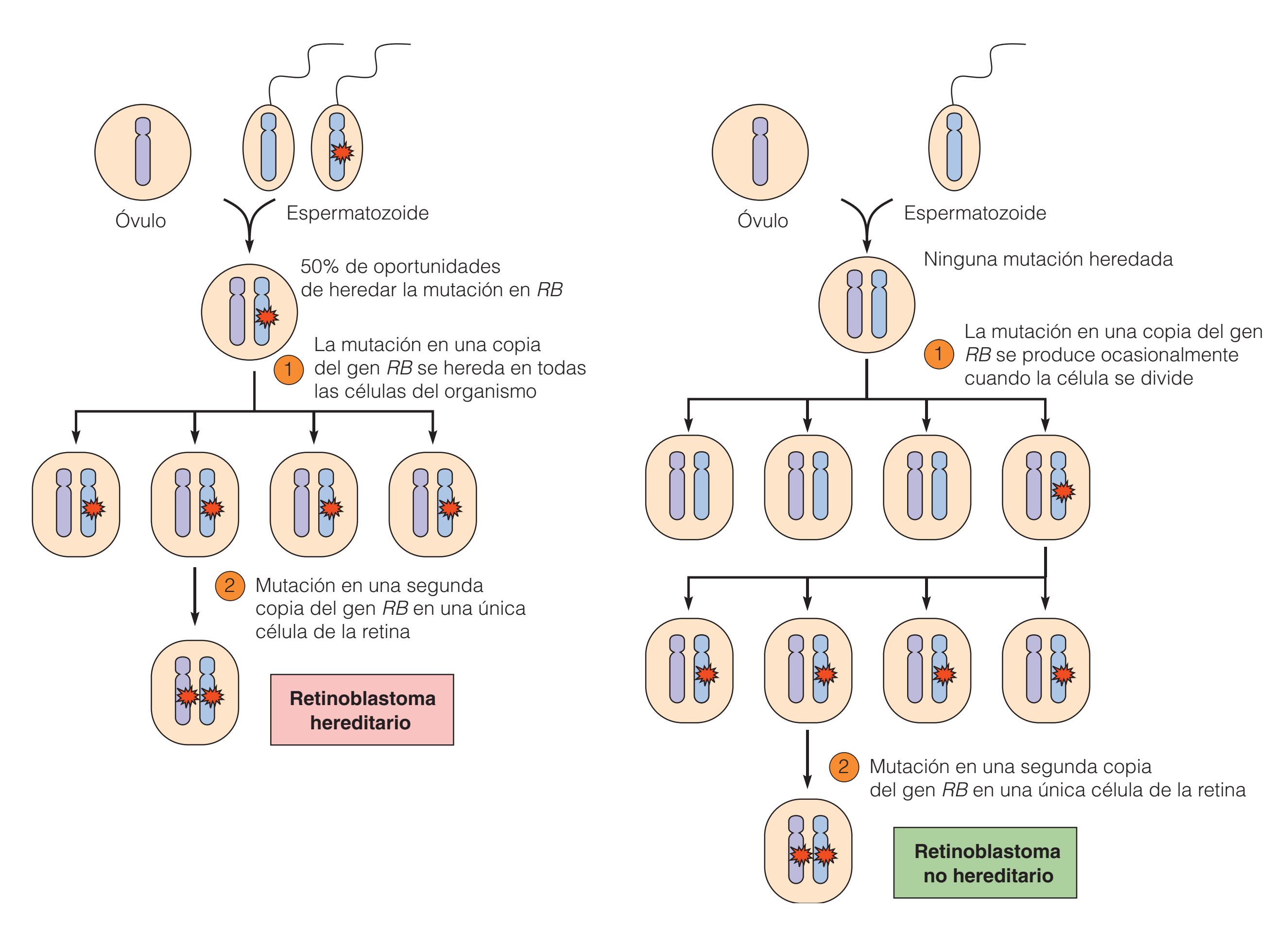


Figura 24.17 Comportamiento de los genes supresores de tumores en los cánceres hereditarios y no hereditarios. Este ejemplo, que implica al gen *RB* y su papel en el retinoblastoma hereditario (un cáncer de ojo), es típico de muchos genes supresores de tumores. (*Izquierda*) Un niño que hereda un gen *RB* defectuoso de uno de los parentales tendrá la mutación en cada célula del cuerpo. Si la copia buena del gen *RB* sufre una mutación sólo en una célula de la retina, ambos genes *RB* serán defectuosos y surgirá el retinoblastoma. (*Derecha*) en las familias que no portan este defecto genético, los niños nacen con dos copias buenas del gen *RB*. Una forma no hereditaria de retinoblastoma puede surgir todavía, pero sólo en el caso improbable de que ambas copias del gen *RB* sufran mutación en la misma célula.

El gen supresor de tumores RB se descubrió estudiando familias con retinoblastoma hereditario

El primer gen supresor de tumores que se identificó, se encontró en estudios sobre *retinoblastoma hereditario*, un cáncer raro del ojo que se desarrolla en niños pequeños que tienen una historia familiar de la enfermedad. Los niños con esta enfermedad heredan una deleción en una región específica del cromosoma 13 de uno de sus padres. Por sí misma, esta deleción no causa cáncer. Pero, durante los múltiples ciclos de división cellular que se producen a medida que el ojo crece, una célula de la retina de un individuo puede adquirir una deleción o una mutación, de forma ocasional, en la misma región de la segunda copia del cromosoma 13, y el cáncer surgirá de tales células. Este patrón sugiere que el cromosoma 13 contiene un gen que normalmente inhibe la proliferación celular, y sugiere que la deleción o alteración de ambas copias del gen debe ocurrir antes de que el cáncer se desarrolle. Comparando los fragmentos del DNA aislados del cromosoma 13 en células normales y del retinoblastoma, se identificó el **gen *RB*** en el gen perdido.

El gen *RB* codifica la proteína Rb, cuyo papel en el control de la progresión de la fase G1 a la fase S del ciclo celular, se describió en el Capítulo 19 (*véase* Figura 19.38). La proteína Rb es parte del mecanismo de frenado que normalmente impide que las células pasen del punto de restricción de G1 y entren en la fase S en ausencia de la señal apropiada de un factor de crecimiento. La alteración de ambas copias del gen RB elimina este mecanismo de restricción y abre la puerta a la proliferación incontrolada. La capacidad de las mutaciones de RB para desatar los controles normales sobre la proliferación celular no se limita al retinoblastoma hereditario, el extraño cáncer de los ojos donde originariamente se identificó. Las mutaciones que alteran la proteína Rb también se han detectado en retinoblastomas no hereditarios y en varios cánceres no hereditarios, incluyendo ciertas formas de cáncer de pulmón, de mama y de vejiga.

La proteína Rb es también el blanco de ciertos tipos de virus. Por ejemplo, el **papilomavirus humano (HPV)** —el virus responsable del cáncer cervical uterino— contiene un oncogén que produce una proteína, denominada *proteína E7*, que se une a la proteína Rb de las células infectadas y le impide frenar la proliferación celular (Figura 24.18, ①). De esta forma, los cánceres desencadenados por una pérdida de la proteína funcional Rb puede surgir o a través de mutaciones que alteran ambas copias del gen *RB* o a través de la acción de proteínas virales que se unen o inactivan a la proteína Rb.

El gen supresor de tumores *p53* es el gen que se muta con más frecuencia en los cánceres humanos

Posteriormente al descubrimiento del gen *RB* a mediados de la década de 1980, se han identificado docenas de genes supresores de tumores adicionales (Tabla 24.2). Uno de los más importantes es el **gen *p53*** (también denominado *TP53* en humanos), que está mutado en un amplio espectro de tumores diferentes. De hecho, más de la mitad de los 10 mi-

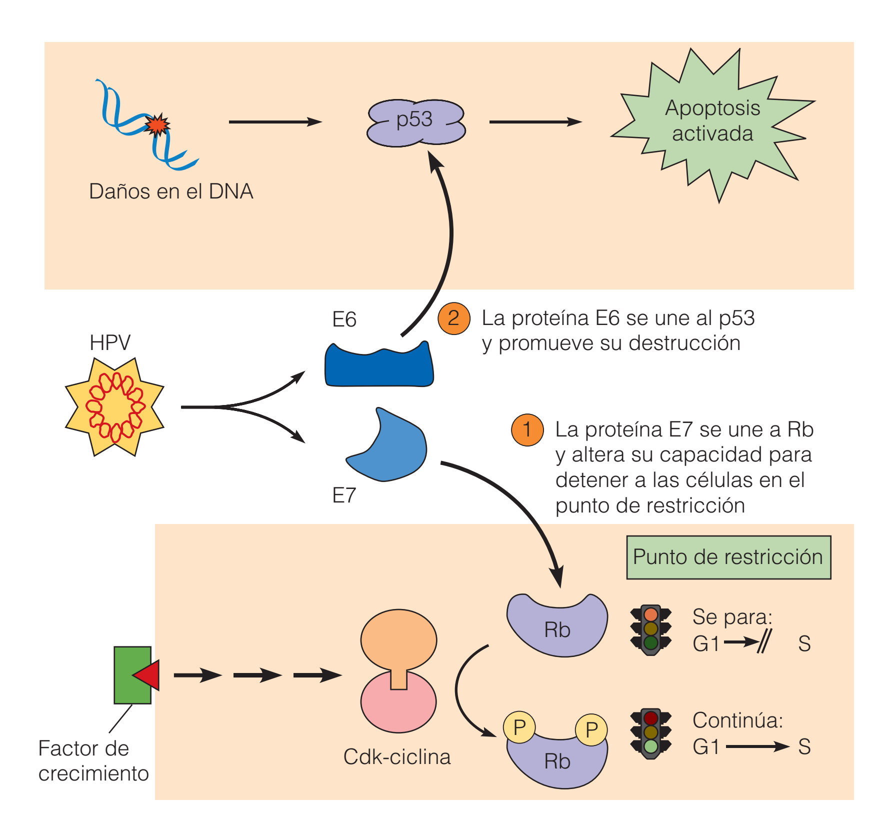


Figura 24.18 Oncogenes del papilomavirus humano (HPV). El HPV posee dos oncogenes que producen proteínas denominadas E6 y E7. ① La proteína E7 se une a la proteína Rb normal de la célula y altera su capacidad de detener a las células en el punto de restricción, contribuyendo de esta forma a la proliferación incontrolada permitiendo una progresión desenfrenada de la fase G1 a la fase S. (El mecanismo por el cual la proteína Rb detiene normalmente a las células en el punto de restricción se muestra en la Figura 19.38.) ② La proteína E6 se une a la proteína p53 de la célula normal, promoviendo de esta forma su destrucción. El resultado es que p53 ya no puede desencadenar más la apoptosis en las células con el DNA dañado.

Tabla 24.2 Ejemplos de genes supresores de tumores humanos

Gen	Síndrome heredado	Tipo de cáncer
APC	Poliposis adenomatosa familiar	Colon
BRCA1	Cáncer de mama familiar	Mama, ovario
BRCA2	Cáncer de mama familiar	Mama
SMAD4	Cáncer colorectal	Colon, recto
NF-1	Neurofibromatosis tipo 1	Neurofibromas
NF-2	Neurofibromatosis tipo 2	Células de Schwann, meninges
CDKN2A	Melanoma familiar	Melanoma, otros
p53	Li-Fraumeni	Óseo, mama, leucemia, cerebro, adrenal, otros
RB	Retinoblastoma hereditario	Retina, óseo, otros
HL	Von Hippel-Lindau	Riñón, retina, cerebro
WT-1	Tumor de Wilms	Riñón

llones de personas de todo el mundo a las que se le diagnostica cáncer cada año tienen mutaciones en el gen *p53*, haciendo de él el gen más mutado de los cánceres humanos.

El gen *p53* codifica la proteína p53, cuyo papel en la protección de las células de los efectos del daño al DNA se describió en el Capítulo 19. Cuando las células se exponen a agentes carcinógenos —tales como a radiaciones ionizantes o a sustancias químicas tóxicas— que causan daños de gran alcance en el DNA, el DNA alterado estimula la ruta del *p53*, que desencadena la detención del ciclo celular y la apoptosis para impedir que las células genéticamente dañadas proliferen (*véase* Figura 19.39). A menudo, este mecanismo de protección se pierde en las células cancerosas debido a las mutaciones que alteran al gen *p53*. La inactivación resultante de la ruta del *p53* contribuye al desarrollo del cáncer permitiendo la supervivencia y la reproducción de las células con el DNA dañado.

Por tanto, no nos sorprende que, como fue el caso para el gen *RB*, los individuos que heredan una copia defectuosa del gen *p53* de un padre presentan mayor riesgo de desarrollar cáncer. En esta enfermedad heredada, denominada *síndrome de Li-Fraumeni*, varios tipos de cáncer tienden a aparecer en los inicios de la edad adulta como resultado de las mutaciones que inactivan a la segunda copia, normal, del gen *p53*. Las mutaciones en el gen *p53* son también comunes en los cánceres no hereditarios desencadenados por la exposición a las sustancias químicas y a la radiación que dañan al DNA. Por ejemplo, los carcinógenos presentes en el humo del tabaco causan varias clases de mutaciones puntuales en el gen *p53* en los cánceres de pulmón, y la luz del sol provoca mutaciones en el gen *p53* en los cánceres de piel. En algunos casos, la mutación en una copia del gen *p53* es suficiente para inutilizar la proteína p53 incluso cuando la otra copia del gen *p53* es normal. La explicación aparente es que la proteína p53 consta de cuatro cadenas de polipéptidos unidas formando un tetrámero, y la presencia de una cadena mutada en el tetrámero puede ser suficiente como para impedir que la proteína funcione de forma apropiada.

Como la proteína Rb, la proteína p53 es el blanco de ciertos cánceres víricos. Por ejemplo, además de producir la proteína *E7* que inactiva Rb, el papilomavirus humano tiene un segundo oncogén que produce la *proteína E6*, que se une a la proteína p53 y la marca para que sea destruida (Figura 24.18, ②). Esto significa que el papilomavirus humano puede bloquear las acciones de las proteínas producidas tanto por el gen supresor de tumores *RB* como por el gen supresor de tumores *p53*.

El gen supresor de tumores *APC* codifica una proteína que inhibe la vía de señalización Wnt

Como el gen *p53*, el siguiente supresor tumoral que consideraremos tiene también una diana común para las mutaciones que causan el cáncer, aunque en este caso los cánceres surgen principalmente en un órgano: el colon. Las mutaciones que afectan al gen en cuestion, denominado **gen *APC***, se asocian con una enfermedad heredable denominada *poliposis adenomatosa familiar*. Los individuos afectados heredan un gen *APC* defectuoso que causa que miles de *pólipos* (tumores benignos) crezcan en el colon y creen casi el 100% de que se desarrolle cáncer de colon alrededor de los 60 años. Aunque la poliposis adenomatosa familiar es una enfermedad rara, que causa menos del 1% de todos los cánceres de colon, las mutaciones en el gen *APC* se desencadenan también por mutágenos medioambientales y ocurren en aproximadamente dos tercios de las formas de cáncer de colon no heredables más comunes.

El gen *APC* afecta al riesgo de cáncer a través de la **vía del Wnt**, que desempeña un papel importante en el control de la proliferación celular y en la diferenciación durante el desarrollo embrionario. Como se muestra en la Figura 24.19, el componente central de la vía Wnt es una proteína denominada *β-catenina*. Normalmente, a la β-catenina le impide funcionar un complejo multiproteico que consta de una proteína producida por el gen *APC* combinado con las proteínas *axin* y la *glucógeno sintasa quinasa 3* (*GSK3*). Cuando se ensambla en este complejo APC-axin-GSK3, GSK3 cataliza la fosforilación de β-catenina. La β-catenina fosforilada se une entonces a ubiquitina, que marca a la β-catenina para su destrucción por los proteosomas (p. 756). El resultado neto es una menor concentración de β-catenina que hace inactiva a la vía Wnt.

La vía Wnt se activa por moléculas de señalización extracelular denominadas *proteínas Wnt*, que se unen y activan a los *receptores Wnt* de la superficie celular. Los receptores activados estimulan a un grupo de proteínas que inactivan al complejo APC-axin-GSK3 y además impiden la degradación de β-catenina. La β-catenina entra entonces en el núcleo e interactúa con los factores de transcrip-

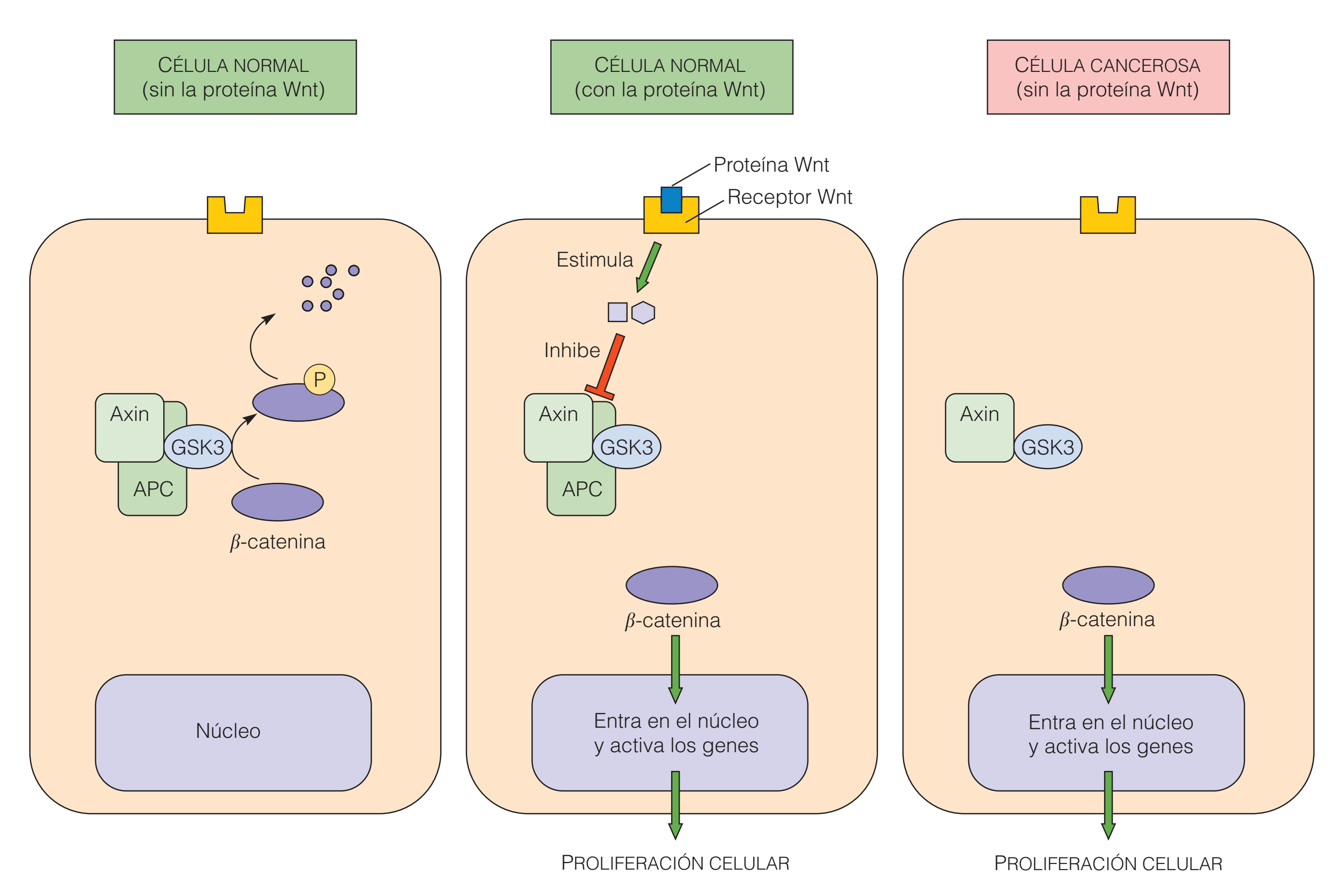


Figura 24.19 La vía de señalización de Wnt. (*Izquierda*) En ausencia de la proteína de señalización del crecimiento Wnt, la β-catenina se marca para su degradación del complejo APC-Axin-GSK3 y la ruta Wnt se mantiene en la posición de APAGADO. *(Medio)* Normalmente la ruta Wnt está ENCENDIDA por las proteínas Wnt, que se unen y activan a unos receptores de la superficie celular. Los receptores activados estimulan a proteínas que inactivan al complejo APC-Axin-GSK3 protegiendo de esta forma a la β-catenina de la degradación. Entonces, la β-catenina entra en el núcleo y activa a una gran variedad de genes blanco, incluyendo a aquellos que controlan la proliferación celular. (*Derecha*) Algunas células cancerosas tienen mutaciones de pérdida de función en el gen *APC*. En ausencia de una proteína APC funcional, el complejo APC-Axin-GSK3 no se puede formar. Como resultado, la β-catenina se acumula y bloquea la ruta Wnt en la posición de ENCENDIDO.

ción que activan una variedad de genes, incluyendo a algunos que estimulan la proliferación celular.

En numerosos cánceres se han detectado mutaciones que causan una activación anormal de la vía Wnt. La mayoría son mutaciones de pérdida de función del gen *APC* que o son heredadas o con más frecuencia, desencadenadas por mutágenos medioambientales. La ausencia de la proteína APC resultante impide que se ensamble el complejo APC-axin-GSK3 y por tanto, la β-catenina se acumula, bloqueando a la vía Wnt en la posición de activada y enviando a la célula una señal de división continua.

Los cánceres humanos se desarrollan por la acumulación escalonada de mutaciones que afectan a oncogenes y a genes supresores de tumores

Estimaciones actuales sugieren que hay más de 100 proto-oncogenes diferentes y varias docenas de genes supresores de tumores en el genoma humano. Para que el cáncer surja es raro que sea suficiente con tener un defecto en uno solo de estos genes, ni tampoco es necesario que un gran número de ellos estén implicados. En lugar de esto, cada tipo de cáncer tiende a estar caracterizado por un pequeño puñado de mutaciones que impliquen la inactivación de los genes supresores de tumores así como la conversión de proto-oncogenes en oncogenes. En otras palabras, crear una célula cancerosa normalmente requiere que los frenos del crecimiento celular (genes supresores de tumores) se liberen y que los aceleradores del crecimiento celular (oncogenes) se activen.

Este principio está muy bien ilustrado por la progresión escalonada hacia la adquisición de la malignidad en el cáncer de colon. Los científicos han aislado DNA de una gran cantidad de pacientes con cáncer de colon y lo han examinado para detectar la presencia de mutaciones. El patrón más común detectado es la presencia del oncogén *KRAS*

(un miembro de la familia del gen RAS) acompañado por mutaciones de pérdida de función en los genes supresores de tumores *APC*, *SMAD4* y *p53* (Tabla 24.3). Los cánceres de colon de crecimiento rápido tienden a mostrar estas cuatro alteraciones genéticas mientras que los tumores benignos tienen sólo una o dos. Esto sugiere que las mutaciones en los cuatro genes suceden de una manera escalonada que se correlaciona con un comportamiento agresivo creciente.

La primera mutación que se detecta de forma rutinaria es la pérdida de función del gen *APC*, que se produce frecuentemente en los pequeños pólipos incluso antes de que surja el cáncer. Las mutaciones en *KRAS* tienden a observarse cuando los pólipos se hacen más grandes, y las mutaciones en *SMAD4* y en *p53* normalmente aparecen cuando el cáncer finalmente se desarrolla. Sin embargo, estas mutaciones no siempre se producen en la misma secuencia o con el mismo juego de genes. Por ejemplo, las mutaciones de *APC* se encuentran en dos tercios de todos los cánceres de colon, pero esto significa que el gen *APC* es normal en uno de cada tres casos. El análisis de los tumores que contienen genes *APC* normales ha revelado que muchos de ellos poseen oncogenes que producen una forma de *β-catenina* hiperactiva anormal, una proteína que —como la proteína APC— está implicada en la señalización de Wnt (Figura 24.19). Puesto que APC inhibe la vía Wnt y la *β*-catenina la estimula, las mutaciones que conducen a la pérdida de APC y las mutaciones que crean formas hiperactivas de *β*-catenina tienen el mismo efecto básico. Ambas incrementan la proliferación celular, aumentando la actividad de la vía Wnt.

Otra ruta que con frecuencia se altera en el cáncer de colon es la *vía del TGFβ-Smad* (página 451) que *inhibe* más que estimula la proliferación celular epitelial. Las mutaciones de pérdida de función en los genes que codifican componentes de esta vía, tales como el receptor del TGF*β* o Smad4, se detectan con frecuencia en los cánceres de colon. Tales mutaciones alteran la actividad inhibidora del crecimiento de la vía TGF*β*-Smad y además contribuyen a amplificar la proliferación celular.

En conjunto, el principio general ilustrado por las diferentes mutaciones del cáncer de colon es que diferentes genes supresores de tumores y oncogenes pueden afectar la misma ruta, y es la alteración de rutas particulares de señalización lo que es importante en las células cancerosas más que las mutaciones genéticas particulares a través de las que se consigue la alteración.

La inestabilidad genética facilita la acumulación de mutaciones en las células cancerosas

La tasa de mutación normal para cualquier gen dado es de aproximadamente uno en un millón por división celular, de forma que parece poco probable que una célula pueda adquirir las series de mutaciones escalonadas necesarias para causar cáncer. La razón de que los cánceres ocurran tan frecuentemente es que las tasas de mutación en células cancerosas son cientos o incluso miles de veces más altas de lo normal.

Este estado denominado **inestabilidad genética**, puede surgir de varias formas diferentes. Un mecanismo implica las alteraciones en la reparación del DNA. Por ejemplo, los defectos heredados en los genes requeridos para *reparar los errores* del DNA (página 628) son responsables del *cáncer de colon hereditario sin poliposis* (*HNPCC*, del inglés *hereditary non polyposis colon cancer*) un síndrome heredado que eleva el riesgo de que una persona tenga cáncer por permitir que las mutaciones se acumulen en vez de que sean corregidas por el sistema de reparación de errores. Otra enfermedad hereditaria el *xeroderma pigmentosum*, está causada por defectos heredados en los genes necesarios para la *reparación de escisiones* (página 627). El Anexo 24A describe cómo el niño que hereda esta enfermedad desarrolla un riesgo ex-

Tabla 24.3 Algunas mutaciones habituales en el cáncer de colon humano*

Gen	Proteína	Categoría	Ruta	Efecto de la mutación
APC	APC	Supresor de tumores	Ruta Wnt	La pérdida de función de la proteína estimula la ruta del Wnt
CTNNB1	*β*-catenina	Oncogén	Ruta Wnt	La proteína del oncogén estimula la ruta del Wnt
KRAS	Ras	Oncogén	Ruta Ras-MAPK	La proteína del oncogén estimula la ruta del Wnt
SMAD4	Smad4	Supresor de tumores	Ruta del TGF*β*-Smad	La pérdida de función de la proteína disminuye la ruta del TGF*β*-Smad**
TGFBR2	Receptor II del TGF*β*	Supresor de tumores	Ruta del TGF*β*-Smad	La pérdida de función de la proteína disminuye la ruta del TGF*β*-Smad**
p53	p53	Supresor de tumores	Respuesta de daño al DNA	La pérdida de función de la proteína promueve la inestabilidad genética
Genes de reparación de errores	Varias enzimas	Supresor de tumores	Reparación de DNA	La pérdida de función de la proteína promueve la inestabilidad genética

* Las mutaciones que tienen efectos similares se agrupan juntas.
** Debido a que la ruta de señalización del TGF*β*-Smad inhibe la proliferación de las células epiteliales, la disminución de la actividad en esta ruta conducirá a amplificar la proliferación celular.

Niños de la luna

El primer informe de una conexión entre un error en la reparación del DNA y la susceptibilidad al cáncer vino a partir de estudios de una rara enfermedad hereditaria denominada **xeroderma pigmentosum**. Los individuos que heredan esta enfermedad son tan sensibles a la radiación ultravioleta (UV) del sol que la exposición unos pocos minutos a la luz del sol es suficiente como para causar severas quemaduras en la piel y cáncer de piel. Puesto que lo único seguro para ellos es salir por la noche, los niños con xeroderma pigmentosum se denominan a veces «niños de la luna». Hay incluso un campamento especial al norte del estado de Nueva York, denominado *Camp Sundown*, que permite a los niños afectados participar en actividades de recreo normales pero en un horario diferente. Las actividades en el exterior comienzan después de la puesta de sol y tienen lugar durante la noche, permitiendo a los niños estar dentro de casa y seguros detrás de las cortinas bajadas al amanecer. Los científicos de la NASA se han interesado por el problema y han diseñado un traje espacial especial que proporciona suficiente protección de la luz del sol como para permitir que los niños con xeroderma pigmentosum desempeñen en el exterior de manera ocasional (Figura 24A.1).

La susceptibilidad al cáncer de piel que es la marca del xeroderma pigmentosum se asocia a defectos hereditarios en la reparación del DNA. En el Capítulo 19 vimos que la radiación UV de los rayos solares puede dañar a las moléculas de DNA desencadenando la formación de los *dímeros de pirimidina*; es decir, la formación de enlaces covalentes entre bases de pirimidina adyacentes (*véase* Figura 19.17c). Si no se reparan esas mutaciones, pueden conducir al cáncer. Una forma de reparar los dímeros de piridina es a través de la *reparación por escisión*, un proceso que reconoce las distorsiones en la doble hélice del DNA y utiliza una serie de enzimas para cortar la región dañada y rellenar el agujero resultante con la correcta secuencia de nucleótidos (*véase* Figura 19.18). A finales de la década de 1960, se publicó por primera vez que las células de los individuos con xeroderma pigmentosum normalmente son incapaces de realizar la reparación por escisión. Como consecuencia de ello, las mutaciones del DNA se acumulaban y finalmente aparecía el cáncer. Estudios posteriores revelaron que las mutaciones en siete genes diferentes pueden alterar la reparación por escisión y, por tanto, causar xeroderma pigmentosum. Cada uno de los siete genes, designados desde *XPA* hasta *XPG*, codifica una enzima implicada en diferentes pasos de la ruta de reparación por escisión.

Las mutaciones que se heredan en un octavo gen, denominado *XPV*, produce una forma laternante de xeroderma pigmentosum en donde la reparación por escisión permanece intacta pero los individuos afectados son todavía susceptibles a los cánceres inducidos por la luz del sol. Esta mutación particular afecta al gen para la DNA polimerasa η (eta), una forma especial de DNA polimerasa que cataliza la *síntesis de la translesión* de una nueva extensión de DNA a través de regiones en donde la hebra molde está dañada (página 627). La DNA polimerasa η es capaz de replicar las regiones de DNA donde los dímeros de pirimidina están presentes e inserta correctamente las bases apropiadas en una nueva hebra de DNA que se está formando. De esta forma, los defectos heredados en la DNA polimerasa η, como los defectos en la reparación por escisión, obstaculizan la capacidad para corregir los dímeros de pirimidina creados por la radiación ultravioleta.

Los defectos en la reparación del DNA heredados por los niños con xeroderma pigmentosum conducen a tasas de cáncer de piel que son 2.000 veces más altas de lo normal. Además, los individuos afectados desarrollan cáncer de piel a la edad de 8 años, comparados con los 60 años para el resto de la población. Aunque el mayor impacto es sobre el cáncer de piel, los defectos en la reparación del DNA vistos en el xeroderma pigmentosum también causan un aumento de 20 veces en el riesgo de leucemia y cánceres de cerebro, pulmón, estómago, mama, útero y testículos.



Figura 24A.1 Un niño con xeroderma pigmentosum jugando fuera de casa. Puesto que la exposición a la luz del sol es peligrosa para los individuos con xeroderma pigmentosum, la NASA ha diseñado unos trajes espaciales especiales para proteger a los niños de la radiación UV del sol.

tremadamente alto ya que son incapaces de reparar los daños del DNA provocados por la exposición a la luz del sol.

En las formas de cáncer de mama hereditario también se ha implicado a la reparación del DNA defectuosa, que es la responsable del 10% de todos los cánceres de mama. Los cánceres de mama hereditarios (y en menor extensión, los cánceres de ovario) surgen en las mujeres que heredan formas de los genes *BRCA1* y *BRCA2* mutados; estos genes codifican proteínas implicadas en la reparación de daños en el DNA, especialmente de los cortes en la doble hebra.

La inestabilidad genética no está restringida a los cánceres desencadenados por defectos hereditarios en la reparación del DNA. La mayoría de los cánceres no son hereditarios pero todavía muestran inestabilidad genética. En algunos casos, la inestabilidad se puede rastrear y encontrar mutaciones en los genes de reparación del DNA causadas por mutágenos medioambientales. Otra explicación es que la vía del *p53* está defectuosa en la mayoría de las células cancerosas, lo que elimina el mecanismo de protección, que de otra forma, destruiría o prevendría la reproducción de las células que contienen DNA dañado.

La inestabilidad genética también puede ser causada por defectos en las mitosis que provocan que los cromosomas se separen de forma inapropiada durante la división celular, dando lugar a cromosomas rotos y a **aneuploidia** (un número anormal de cromosomas). Aunque los mecanismos que subyacen a estos defectos mitóticos no se conocen bien, algunas células cancerosas poseen *centrosomas* extras, que son las estructuras que organizan el ensamblaje de los microtúbulos durante la formación del huso. Los centrosomas extra pueden causar la formación de husos anormales que usen más de dos polos del huso y de esta forma los cromosomas no se pueden separar de forma apropiada durante la división celular (Figura 24.20). En células cancerosas también se han detectado defectos en proteínas implicadas en el anclaje de los cromosomas al huso o en monitorizar *el punto de chequeo del huso* (página 647). Si tales mecanismos no funcionan apropiadamente, no hay garantía de que cada célula hija producida durante la división celular reciba el juego apropiado de cromosomas.

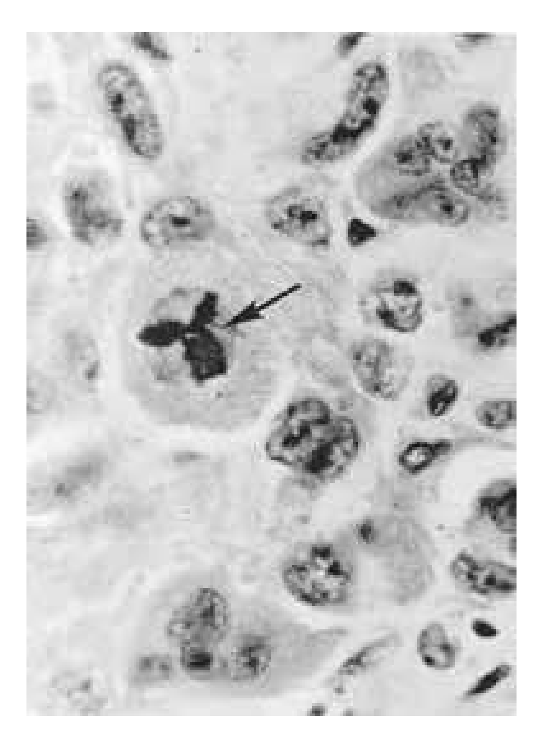


Figura 24.20 Una célula cancerosa sufriendo una mitosis anormal. Esta muestra de tejido tumoral visto al microscopio óptico muestra a una célula con un huso mitótico anormal que contiene tres polos del huso. Tales husos, que no pueden separar los cromosomas apropiadamente, se crean por la presencia de tres centrosomas en vez de los dos normales.

Los genes que codifican proteínas implicadas en la reparación del DNA y en la clasificación de los cromosomas se ajustan a la definición básica de genes supresores de tumores, genes como el *RB*, *p53* y *APC*, que producen proteínas que impiden la proliferación celular y cuya pérdida conduce al cáncer directamente. Para distinguir entre las dos clases de genes supresores de tumores, los genes como *RB*, *p53* y *APC* se denominan genes porteros (del inglés, *gatekeepers*) porque su pérdida abre directamente a la proliferación celular excesiva y a la formación de tumores. Por el contrario, los genes implicados en la reparación del DNA y de clasificación de cromosomas se denominan genes guardianes (del inglés, *caretakers*) porque mantienen la estabilidad genética pero no están directamente implicados en controlar la proliferación celular. Los defectos en los genes guardianes simplemente facilitan la acumulación de mutaciones en otros genes (incluyendo los genes porteros) que a cambio desencadenan la proliferación excesiva y el cáncer.

En resumen: los marcas distintivas del cáncer

Puesto que muchas combinaciones de mutaciones que afectan a genes supresores de tumores y a oncogenes pueden conducir al cáncer, la cuestión que se plantea es si hay principios comunes que ayudasen a simplificar la situación. Como concepto unificador, Douglas Hanahan y Robert Weinberg propusieron para el desarrollo del cáncer es común y esencial la adquisición de una serie de seis rasgos, pero que cada uno se puede adquirir a través de una variedad de mecanismos genéticos y epigenéticos diferentes. Las seis «marcas distintivas del cáncer» son las que siguen:

1. **Auto-suficiencia en señales de crecimiento**. Las células normalmente no proliferan si no se estimulan apropiadamente por un factor de crecimiento. Las células cancerosas escapan de estos requerimientos a través de la acción de oncogenes que producen cantidades excesivas o versiones mutadas de proteínas implicadas en las rutas estimuladoras del crecimiento (Tabla 24.1). Una de estas rutas que se activa normalmente en el cáncer es la ruta de Ras. Entre el 25 y el 30% tienen proteínas Ras mutadas que proporcionan un estímulo continuo para que las células proliferen independientemente de los factores de crecimiento. Las mutaciones que afectan a otros componentes de la vía de Ras también son comunes.
2. **Insensibilidad a las señales anti-crecimiento**. Los tejidos normales están protegidos de la proliferación celular excesiva por una variedad de mecanismos inhibidores del crecimiento. Las células cance-

rosas deben evadir tales señales anti-crecimiento si quieren continuar proliferando. La mayoría de las señales anti-crecimiento actúan durante la parte final de G1 y ejercen sus efectos a través de la proteína Rb, cuya fosforilación regula el paso a través del punto de restricción hacia la fase S. Por ejemplo, el TGFβ normalmente inhibe la proliferación desencadenando la ruta TGFβ-Smad, que produce inhibidores de cdK que bloquean la fosforilación de Rb y además impiden el paso de la fase G1 a la fase S. En las células cancerosas, la ruta TGFβ-Smad está alterada por una gran variedad de mecanismos diferentes, incluyendo las mutaciones, cambios epigenéticos e interacciones con proteínas virales. Las mutaciones en el gen *RB* también hacen a las células insensibles a los efectos del anti-crecimiento de TGFβ o de cualquier otro inhibidor del crecimiento que ejerza su efecto a través de la proteína Rb.

3. **Evasión de la apoptosis.** La evasión de la apoptosis, que destruiría las células genéticamente dañadas, es crucial para la supervivencia de las células cancerosas. Con frecuencia, esto se lleva a cabo por la existencia de mutaciones con pérdida de función en el gen supresor de tumores *p53*, que altera la vía principal por la que si el DNA resulta dañado se desencadenaría la apoptosis. Varios oncogenes, tales como *BCL2*, también promueven la supervivencia de las células cancerosas produciendo proteínas que interfieren con la apoptosis.

4. **Potencial replicativo sin límite.** El efecto global de los tres rasgos precedentes es desacoplar a las células cancerosas de los mecanismos que normalmente equilibran la proliferación celular con las necesidades de nuevas células del organismo. Sin embargo, esto no aseguraría la proliferación ilimitada en ausencia de un mecanismo de reincorporación de secuencias teloméricas que se han perdido de los extremos de cada cromosoma en cada ciclo de replicación del DNA. El mantenimiento de los telómeros, se consigue activando el gen codificador de la telomerasa, pero unas pocas células cancerosas activan un mecanismo alternativo para mantener los telómeros que implica el intercambio de información de las secuencias entre cromosomas. En cada caso, las células cancerosas, mantienen la longitud de los telómeros por encima de un umbral crítico y retienen de ese modo la capacidad para dividirse indefinidamente.

5. **Angiogénesis sostenida.** En ausencia de un aporte sanguíneo, los tumores no crecerán más allá de unos pocos centímetros de diámetro. De esta manera, en algún punto del desarrollo temprano del tumor, las células cancerosas deben desencadenar la angiogénesis. Una estrategia común implica la activación de los genes que codifican a estimuladores de la angiogénesis combinada con la inhibición de genes que codifican a inhibidores de la angiogénesis. Los mecanismos que subyacen a tales cambios en la expresión de los genes no se conocen bien, pero en algunos casos están ligados a las actividades de los genes supresores de tumores conocidos o de oncogenes. Por ejemplo, la proteína p53 activa al gen que codifica al inhibidor de la angiogénesis trombospondina; de ahí que la pérdida de la función de p53, que se produce en la mayoría de los cánceres humanos, puede provocar una caída de los niveles de trombospondina. En cambio, los oncogenes RAS desencadenan el aumento en la expresión de los genes que codifican al activador de la angiogénesis VEGF.

6. **Invasión del tejido y metástasis.** La capacidad para invadir tejidos circundantes y metastatizar en lugares alejados es la característica definida que diferencia un cáncer de un tumor benigno. Las células cancerosas muestran tres propiedades que desempeñan un papel crucial en estos acontecimientos: la adhesión célula a célula disminuida, motilidad aumentada y la producción de proteasas que degradan la matriz extracelular y la membrana basal. La adhesividad disminuida se produce con frecuencia por cambios en la *E-cadherina*, que se pierde en la mayoría de los cánceres epiteliales o bien por mutación, expresión génica disminuida o destrucción de la propia E-cadherina. Los cambios en otras moléculas implicadas en adhesión de las células cancerosas, motilidad y producción de proteasas también desempeñan un papel en la invasión y en la metástasis. Sin embargo, los mecanismos que subyacen a estos cambios moleculares no se conocen completamente y parecen diferir entre tipos de tumores y medioambientes titulares.

Un rasgo facilitador: la inestabilidad genética. Para adquirir los seis rasgos precedentes, las células cancerosas necesitan acumular más mutaciones de las que se generan a la velocidad de mutación normal. Las células deben ser genéticamente inestables antes de que se puedan acumular las mutaciones suficientes que causan cáncer. La inestabilidad genética surge con frecuencia a partir de mutaciones que alteran la capacidad de la ruta del *p53* para desencadenar la destrucción de células genéticamente dañadas. Sin embargo, también hacen su papel, los defectos en los genes que codifican proteínas implicadas en la reparación del DNA y en la clasificación de los cromosomas. La inestabilidad genética se sitúa en una categoría separada de los seis rasgos «distintivos» del cáncer, que están directamente implicados en la proliferación y diseminación de las células cancerosas, puesto que la inestabilidad genética simplemente permite a las poblaciones de células cancerosas en desarrollo, adquirir los seis rasgos distintivos.

Diagnóstico, detección y tratamiento

En los últimos años se han realizado grandes progresos intentando elucidar las anormalidades genéticas y bioquímicas que subyacen al desarrollo del cáncer. Una de las esperanzas de esta investigación es que nuestro conocimiento creciente de las alteraciones moleculares mostradas por las células cancerosas conducirá finalmente a mejorar las estrategias de diagnóstico y tratamiento del cáncer.

El cáncer se diagnostica por observación microscópica de muestras de tejido

Puesto que el cáncer puede surgir en casi cualquier tejido, no se puede generalizar de manera coherente si nos atenemos a los síntomas de la enfermedad. Un diagnóstico definitivo normalmente requiere una *biopsia*, que implica que retirar quirúrgicamente una pequeña muestra tejido para examinarla al microscopio. Aunque no se observan rasgos suficientes como para indicar las células cancerosas al microscopio, las células normalmente muestran un conjunto de características que juntas indican la presencia de cáncer (Tabla 24.4). Por ejemplo, las células cancerosas tienen, a menudo, grandes núcleos con forma irregular, nucleolos prominentes y un índice elevado del volumen del núcleo con respecto al citoplasma. Los cánceres tienden a mostrar una variabilidad significativa en el tamaño y forma de la célula, así como una pérdida de la organización normal del tejido. En gran medida, las células cancerosas pierden las propiedades de especialización bioquímica y estructural de las células que residen normalmente en el tejido de origen. Los cánceres normalmente tienen más células en división de lo normal, lo que significa que el índice mitótico (página 606) será elevado. Y finalmente, los cánceres tienen una periferia externa pobremente definida, con signos de células tumorales penetrando en los tejidos circundantes.

Si se observa un número suficiente de estas características en el examen microscópico, se puede concluir que el cáncer está presente —*incluso si la invasión y la metástasis todavía no se han producido*—. En otras palabras, la presencia de estas características indica un tumor que si se deja sin tratar finalmente se diseminará por invasión y metástasis. La severidad de las anormalidades macroscópicas observadas varían significativamente entre los cánceres, incluso cuando surgen del mismo tipo celular y del mismo órgano. Esta variabilidad forma las bases de la **gradación del tumor**, que es la asignación de grados numéricos a tumores basados en las diferencias en su apariencia microscópica.

Los grados numéricos más bajos (por ejemplo, el grado 1) se asignan a tumores cuya cuyas células muestran características diferenciadas, se dividen lentamente, y manifiestan sólo modestas anormalidades en los rasgos citados en la Tabla 24.4. Los números más altos (por ejemplo, grado 4) se asignan a tumores que tienen células que se dividen rápidamente, que están pobremente diferenciadas y que presentan menos parecido con las células normales y que muestran severas anormalidades en los rasgos del listado de la Tabla 24.4. Los cánceres que tienen el grado más alto contienen células **anaplásicas**, que significa que están tan poco diferenciadas y de apariencia y organización tan anormal que no presentan parecido con las células del tejido en las que ha surgido el tumor. Esos cánceres de alto grado tan anaplásicos, tienden a crecer y diseminarse más agresivamente y responden peor a la terapia que los cánceres de baja gradación.

Las técnicas de diagnóstico, para la detección precoz pueden prevenir muchas muertes por cáncer

Cuando se detecta el cáncer antes de que se disemine, las tasas de curación suelen ser muy altas, incluso para los cánceres que de otra forma tendrían mal pronóstico. Además, existe una gran necesidad de explorar técnicas que de forma rutinaria detecten cánceres en estadios precoces. Uno de los procedimientos de detección con más éxito es la **prueba de Papanicolaou**, una técnica para la detección precoz del cáncer cervical que se desarrolló a principios de la década de 1930 por George Papanicolaou (de quien se le dio el nombre). El fundamento de subyacente de este procedimiento es que la aparición microscópica de las células cancerosas es tan característica que es posible detectar la posible presencia de cáncer simplemente observando unas pocas células aisladas. La prueba de Papanicolaou se realiza tomando una pequeña muestra de las secreciones vaginales de una mujer y examinándolas con un microscopio. Si las células del fluido muestran características poco

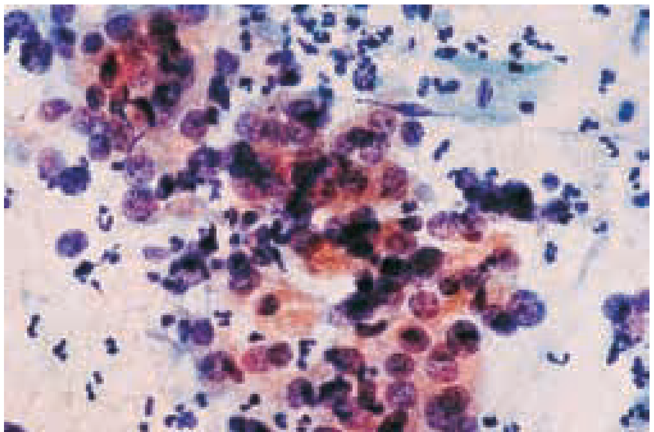
Tabla 24.4 Algunas diferencias en la apariencia microscópica de los tumores benignos y malignos

Rasgo	Benigno	Maligno
Tamaño nuclear	Pequeño	Grande
Índice N/C (índice de volumen nuclear respecto al citoplasma)	Bajo	Alto
Forma del núcleo	Regular	Pleomórfico (forma irregular)
Índice mitótico	Bajo	Alto
Organización tisular	Normal	Desorganizada
Diferenciación	Bien diferenciado	Pobremente diferenciado (anaplásico)
Límite tumoral	Bien definido	Pobremente definido

habituales, tales como núcleos grandes e irregulares o variaciones prominentes en la forma y tamaño celular (Figura 24.21), es un signo de que el cáncer puede estar presente y es necesario realizar estudios en mayor profundidad. Puesto que la prueba de Papanicolaou permite detectar el cáncer cervical en estadios precoces antes de que se hayan producido metástasis, este procedimiento ha impedido cientos de miles de muertes por cáncer.

El éxito de la prueba de Papanicolaou condujo al desarrollo de técnicas de detección para otros cánceres. Por ejemplo, la *mamografía* utiliza una técnica especial de rayos X que busca signos precoces del cáncer de mama, y la *colonoscopia* utiliza un delgado instrumento de fibra óptica para examinar el colon y detectar signos precoces de cáncer de colon. El procedimiento de detección ideal permitiría a los médicos detectar los cánceres en cualquier parte del cuerpo con un simple mecanismo, como un análisis de sangre. El cáncer de próstata es un ejemplo de un cáncer que a veces se puede detectar de esta forma. A los hombres de 50 años con frecuencia se les suele aconsejar que se realicen un análisis de PSA, que mide cuánto *antígeno prostático específico* (del inglés, *prostate-specific antigen* (*PSA*) está presente en el torrente circulatorio. El PSA que es una proteína producida por las células de la glándula prostática, aparece normalmente sólo en pequeñas cantidades en sangre. Si el análisis de PSA revela una elevada concentración de PSA, indica la existencia de un problema de próstata y se tienen que realizar más análisis en detalle para determinar si un cáncer está o no finalmente presente.





30 μm

Figura 24.21 **Prueba de Papanicolaou normal y anormal.** (*Arriba*) En una prueba de Papanicolaou normal, las células son relativamente uniformes en tamaño y tienen núcleos esféricos pequeños. (*Abajo*) En esta prueba de Papanicolaou anormal, son evidentes las variaciones tan marcadas tanto para el tamaño celular como para la forma; los núcleos son más grandes respecto al tamaño de las células. Las anormalidades presentadas por estas células aisladas sugieren que pueden derivar de un cáncer cervical por lo que es necesario un examen del útero en detalle.

Otros cánceres también liberan pequeñas cantidades de proteínas específicas en el torrente circulatorio donde su presencia se utilizaría como señal de la existencia de los estadios iniciales de una enfermedad. Para investigar esos pequeños cambios en las proteínas sanguíneas, los científicos experimentaron con un abordaje general denominado *análisis proteómico* que analiza las proteínas presentes en la sangre. (Revise en el Capítulo 18 que el término *proteoma* se refiere al juego completo de proteínas producido por el genoma de un organismo.) La clave de la mayoría de las técnicas de las técnicas de proteómica es la *espectrometría de masas*, un método de alta velocidad y extremadamente sensible para identificar proteínas basándose en diferencias en la masa y la carga eléctrica. Puesto que una muestra de sangre contiene miles de proteínas diferentes, los datos generados por análisis proteómico pueden ser extraordinariamente complejos. Para abordar este problema, los softwares informáticos de inteligencia artificial se usan para comparar patrones complejos de proteínas observados en las muestras de sangre de individuos con o sin cáncer.

Uno de los primeros cánceres que se investigaron de esta forma, fue el cáncer de ovarios. Cuando se detectaba el cáncer de ovarios antes de que se diseminara, la tasa de supervivencia de cinco años superaba el 95%. Sin embargo, los estadios precoces presentan pocos síntomas y se detectan de forma temprana relativamente pocos casos, de manera que menos del 50% de las mujeres con esta enfermedad sobrevive más de cinco años. Obviamente se necesitan mejores técnicas de detección. Usando el análisis proteómico los científicos han identificado recientemente un patrón de cinco proteínas en la sangre de una mujer con cáncer de ovario que no se había observado en la sangre de otra mujer. Los estudios iniciales indicaban que el análisis tenía una especificidad del 95%, lo que significa que 95 de cada 100 mujeres que muestran el patrón de cinco proteínas anormal tendrá cáncer de ovario. Informaciones posteriores sugieren que es posible mejorar aún más la sensibilidad del análisis.

También se están desarrollando procedimientos de detección por proteómica para un número de cánceres comunes. Aunque tales abordajes están todavía en su infancia

y quedan por resolver numerosos obstáculos, se espera que muchos cánceres puedan ser finalmente detectados en sus estadios precoces usando técnicas de proteómica que identifiquen pequeños cambios en la composición proteica de la sangre.

Cirugía, radiación y quimioterapia, son los tratamientos estándar del cáncer

Las personas diagnosticadas con cáncer tienen varios tratamientos opcionales que dependen tanto del tipo de cáncer implicado y de lo lejos que se haya diseminado. El abordaje más habitual implica cirugía para eliminar el tumor primario seguido (si es necesario) de una terapia de radiación y/o quimioterapia para destruir cualquier célula cancerosa remanente.

La *terapia de radiación* emplea rayos X de elevada energía u otras formas de radiaciones ionizantes para matar a las células cancerosas. Al principio de este capítulo vimos que los daños en el DNA creados por las radiaciones ionizantes podían causar cáncer pero irónicamente el mismo tipo de radiación también se empleaba en altas dosis para destruir células cancerosas en gente que ya tenía la enfermedad. Las radiaciones ionizantes matan a las células de dos formas diferentes. La primera es que los daños causados en el DNA por la radiación activan la ruta de señalización de p53, que entonces desencadena la muerte celular por apoptosis. Sin embargo, muchos cánceres tienen mutaciones que inutilizan la ruta del p53, de manera que la apoptosis inducida por p53 desempeña sólo un papel modesto en la respuesta de la mayoría de los cánceres al tratamiento por radiación. En el segundo mecanismo, la radiación mata a las células causándoles daños cromosómicos que son tan severos que impiden a las células progresar en la mitosis y las células mueren por tanto mientras tratan de dividirse.

La mayoría de las formas de *quimioterapia* utilizan drogas que, como a radiación, intentan matar a las células en división. Tales drogas se pueden subdividir en cuatro categorías principales. (1) A*ntimetabolitos* que inhiben las rutas metabólicas requeridas para la síntesis de DNA actuando como inhibidores competitivos que se unen a los sitios activos del enzima en el lugar de las moléculas sustrato normales. Los ejemplos incluyen *metotrexato*, *fluorouracil*, y *mercaptopurina*. (2) *Agentes alquilantes* que inhiben la función del DNA a base de formar puentes químicos cruzados en la doble hélice del DNA. Los ejemplos incluyen *ciclofosfamida*, *clorambucil* y *cisplatino*. (3) *Antibióticos*, son sustancias fabricadas por microorganismos que inhiben el funcionamiento del DNA bien uniéndose a él o bien inhibiendo a las topoisomerasas necesarias para la replicación del DNA. Los ejemplos incluyen *bleomicina* y *doxorrubicina*. (4) *Drogas derivadas de plantas* o inhiben a las topoisomerasas o alteran los microtúbulos del huso mitótico. Los ejemplos incluyen el inhibidor de topoisomerasas *etopósido* o la droga que disgrega a los microtúbulos, *taxol*.

Un problema con tales drogas (y con la terapia de radiación) es que son tóxicas para las células normales en división así como para las células cancerosas. Cuando aparece el cáncer en un tejido cuyo crecimiento requiere la presencia de una hormona específica, se puede tratar de manera menos tóxica usando drogas que bloquean la acción de una hormona en particular. Por ejemplo, muchos cánceres de mama requieren estrógenos para su crecimiento. Como vimos en el Capítulo 23, los estrógenos ejercen sus efectos uniéndose a proteínas del receptor nuclear que activan la expresión de genes específicos. La droga *tamoxifen*, un tratamiento habitual para el cáncer de mama se une a receptores de estrógenos en el lugar del estrógeno e impide que el receptor se active.

Las inmunoterapias explotan la capacidad del sistema inmune de reconocer a las células cancerosas

El uso de la cirugía, la radiación o la quimioterapia —o sola o en varias combinaciones— puede curar o prolongar de manera significativa los tiempos de supervivencia en muchos tipos de cáncer, especialmente cuando la enfermedad se diagnostica precozmente. Sin embargo, algunos de los cánceres más agresivos (tales como aquellos que afectan al pulmón, al páncreas o al hígado) son difíciles de controlar de esta forma, y los abordajes actuales no tienen mucho éxito con los cánceres diagnosticados en estadios avanzados. En su intento por encontrar maneras más efectivas para tratar esos cánceres, los científicos han estado buscando «balas mágicas» que de forma selectiva buscan y destruyen las células cancerosas sin dañar en el proceso a las células normales.

Una estrategia para introducir esta selectividad en el tratamiento del cáncer es explotar la habilidad del sistema inmune para reconocer las células cancerosas. Este abordaje denominado **inmunoterapia**, se propuso por primera vez en 1800 después de que los médicos se fijaran que de forma ocasional los tumores retroceden en gente que desarrolla infecciones bacterianas. Puesto que las infecciones desencadenan una respuesta inmune, los intentos posteriores se encaminaron en esa línea de observaciones utilizando bacterias vivas o muertas para provocar al sistema inmune de los pacientes con cáncer. Aunque este abordaje no ha funcionado también como inicialmente se esperaba, se ha observado algún éxito con el *Bacilo Calmette-Guérin (BCG)* —una cepa bacteriana que no provoca la enfermedad pero obtiene una respuesta inmune fuerte en el lugar por donde se introduce en el organismo—. El BCG es útil en el tratamiento de los cánceres de vejiga de estadios precoces que se localizan en la pared de la vejiga. Después de que el tumor primario se ha eliminado por cirugía, la inserción del BCG en la vejiga obtiene una activación prolongada de las células inmunes que a cambio conduce a tasas más bajas de recurrencia del cáncer.

Mientras que se demuestra la utilidad potencial de la estimulación inmune, el BCG se debe administrar directamente en la vejiga para provocar una respuesta inmune en el lugar del tumor primario. Para tratar los cánceres que ya han metastatizado en localizaciones desconocidas, se debe estimular la respuesta inmune allí por dondequiera hayan viajado las células. Las proteínas normales que el cuerpo produce para estimular al sistema inmune a veces son útiles para este propósito. El *interferón alfa* y la *interleukina-2 (IL-2)* son de esas proteínas que se han utilizado con éxito como drogas para tratar ciertos tipos de cáncer. Existen en proceso intentos de desarrollar vacunas que introduzcan antígenos de células cancerosas en pacientes para estimular al sistema inmune para que ataque a las células cancerosas.

Otra forma de utilizar el sistema inmune para luchar contra el cáncer es con *anticuerpos*, que son proteínas cuya habilidad para reconocer y unirse a moléculas blanco con una especificidad extraordinaria las hace especialmente apropiadas para servir como agentes que atacan de forma selectiva a las células. El Anexo 24B describe una técnica para manufacturar anticuerpos puros («monoclonales») en grandes cantidades e ilustra cómo tales anticuerpos se utilizan de manera habitual para tratar el cáncer.

La herceptina y el gleevec son drogas contra el cáncer que actúan a través de un marcaje molecular

Hasta principios de la década de 1980, el desarrollo de nuevas drogas contra el cáncer se enfocó fundamentalmente sobre agentes que alteraban el DNA y que interferían con la división celular. Mientras que tales drogas eran útiles en el tratamiento del cáncer, su efectividad estaba con frecuencia limitada por los efectos tóxicos sobre las células normales en división. En las dos décadas pasadas, la identificación de genes individuales que están mutados o que se expresan de manera anormal en las células cancerosas ha creado una nueva posibilidad —**el marcaje molecular**— en donde las drogas se diseñan para marcar específicamente a aquellas proteínas que son críticas para la célula cancerosa.

Un abordaje para la realización del marcaje molecular implica el uso de anticuerpos monoclonales que se unen a las proteínas implicadas en las rutas de señalización que conducen a la proliferación de las células cancerosas. El primer anticuerpo que se aprobó para su uso en pacientes con cáncer fue la *Herceptina*, que se une e inactiva el receptor del factor de crecimiento producido por el gen *ERBB2*. Como vimos anteriormente en el capítulo, alrededor del 25% de todos los cánceres de mama y de ovario han amplificado genes *ERBB2* que producen cantidades excesivas de este receptor. Cuando los individuos con tales cánceres se tratan con Herceptina, el anticuerpo Herceptina se une al receptor e inhibe su capacidad para estimular la proliferación celular, de esa forma, enlentece o paraliza el crecimiento del tumor.

Una forma alternativa de marcaje de moléculas por inactivación, llamada *diseño racional de droga*s, implica la síntesis en el laboratorio de *pequeñas moléculas inhibidoras* que se diseñan para inactivar proteínas diana específicas. Una de las primeras drogas anticancerosas desarrolladas de esta forma fue *Gleevec*. Gleevec es una pequeña molécula que se une e inhibe a una tirosina quinasa anormal producida por el oncogén *BCR-ABL*, cuya asociación con la leucemia mielógena crónica se describió en este capítulo con anterioridad. El oncogén *BCR-ABL* surge de la fusión de dos genes que no están relacionados y produce una tirosina quinasa estructuralmente anormal que representa un blanco ideal para la droga porque se produce sólo por las células cancerosas. La efectividad del Gleevec como tratamiento para los primeros estadios de la leucemia mielógena es bastante impactante. Más de la mitad de los pacientes tratados con Gleevec no tenían signos de cáncer 6 meses después del tratamiento, una tasa de respuesta 10 veces mejor que la observada con tratamientos previos.

Basándose en los esperanzadores resultados obtenidos con la Herceptina y el Gleevec, actualmente hay en desarrollo docenas de otras drogas que utilizan el principio del marcaje molecular: las tirosinas quinasas y los receptores de factores de crecimiento (los blancos para Gleevec y Herceptina) son sólo dos de los muchos blancos potenciales para estas drogas. La proliferación incontrolada de las células cancerosas está causada por alteraciones en variedad de vías de señalización, y cualquiera de las proteínas implicadas en estas vías son blancos potenciales para las drogas anticáncer. Asimismo, cualquier otra proteína que contribuya a una de las seis marcas distintivas de las células cancerosas podría también marcarse.

Las terapias anti-angiogénicas actúan atacando el aporte sanguíneo del tumor

Anteriormente en este capítulo, hemos visto que mantener el crecimiento del tumor depende de la *angiogénesis* —es decir, del desarrollo de nuevos vasos sanguíneos que aportan nutrientes y oxígeno al tumor y retiran productos de desecho—. Es además lógico esperar que los inhibidores de la angiogénesis pudieran ser agentes útiles para tratar el cáncer. El respaldo inical para el concepto de *terapia anti-angiogénica* procedió de los estudios de Judah Folkman, quien publicó que el tratamiento de ratones portadores de tumores con las proteínas inhibidoras de la angiogénesis *angiostatina* y *endostatina* hacía que los tumores se redujeran y desaparecieran (Figura 24.22). Cuando tales experimentos se describieron por primera vez en 1998 en la primera página del *New York Times*, se publicó a un científico distinguido diciendo, «Judah va a curar el cáncer en dos años».

No es necesario decir, que tal cobertura sensacionalista de la noticia condujo a expectativas nada realistas con respecto a las posibilidades de una rápida curación del cáncer.

Anticuerpos monoclonales y tratamiento del cáncer

Una forma en la que opera el sistema inmune es produciendo **anticuerpos**, que son proteínas solubles que se unen e inactivan sustancias, denominadas **antígenos**, que provocan una respuesta inmune. Para funcionar como un antígeno, normalmente una sustancia debe ser reconocida como «extraña» —es decir, diferente de las moléculas que normalmente se encuentran en el cuerpo de una persona—. Las moléculas de anticuerpo reconocen y se unen a antígenos específicos con extraordinaria precisión, haciéndoles perfectamente apropiados para servir como «balas mágicas» que marcan a los antígenos de forma selectiva para los que son exclusivos o que se acumulan de forma preferencial en las células cancerosas.

Durante muchos años, el uso de anticuerpos para tratar el cáncer estuvo obstaculizado por la ausencia de un método reproductible para producir grandes cantidades de moléculas de anticuerpo puras dirigidas contra el mismo antígeno. Entonces, en 1975, Georges Köhler y Cesar Milstein resolvieron el problema al concebir el procedimiento ilustrado en la Figura 24B.1. En esta técnica, a los animales se les inyecta con el antígeno de interés, y unas semanas más tarde se aíslan del animal los linfocitos que producen anticuerpos. Dentro de tal población de linfocitos, cada linfocito produce un único de anticuerpo dirigido contra un antígeno en particular. Para facilitar la selección y crecimiento de los linfocitos individuales, se fusionan con células que se dividen rápidamente y que cuando crecen en cultivo tienen un periodo de vida ilimitado. Las células híbridas individuales se seleccionan y crecen para formar unas series de clones denominados *hibridomas.* Los anticuerpos producidos por los hibridomas se denominan **anticuerpos monoclonales** porque cada uno de ellos es un anticuerpo puro producido por una población clonada de linfocitos.

Para obtener anticuerpos monoclonales que pudieran ser útiles para tratar el cáncer, se inyecta en los ratones tejido canceroso humano para estimular la respuesta inmune. Los hibridomas se crean utilizando linfocitos de animales inmunizados, y el hibridoma se analiza para determinar cuál produce anticuerpos dirigidos contra los antígenos presentes en el tejido canceroso. Puesto que los anticuerpos derivan de ratones y pueden ser destruidos por el sistema inmune de una persona, normalmente se hacen más parecidos a los humanos sustituyendo grandes porciones de la molécula de anticuerpo del ratón con secuencias correspondientes derivadas de anticuerpos humanos. Cuando tales anticuerpos se inyectan en individuos con cáncer, se unen a las células cancerosas y su presencia desencadena un ataque inmune que destruye sólo aquellas células a las que el anticuerpo se ha unido.

El abordaje anterior está empezando a ser aplicado en los cánceres humanos. Por ejemplo, los anticuerpos que marcan al *antígeno CD20* que se encuentra en la superficie de las células del *linfoma no de Hodgkin* están entre los tratamientos estándar para este tipo de cáncer en particular. Los anticuerpos también pueden servir como vehículos de entrega para ligarlos a moléculas radiactivas o a otras sustancias tóxicas demasiado letales como para administrarlas solas. Uniendo estas sustancias a anticuerpos se permite que las toxinas se concentren selectivamente en los lugares donde se encuentra el tumor sin acumular niveles tóxicos en otras partes del cuerpo. Finalmente se están desarrollando anticuerpos que se unen a proteínas específicas inactivas implicadas en las vías de señalización que dirige la proliferación de las células cancerosas. El anticuerpo monoclonal *Herceptina*, descrita en la página 867 es un ejemplo de una droga anti-cáncer que trabaja de esta forma.

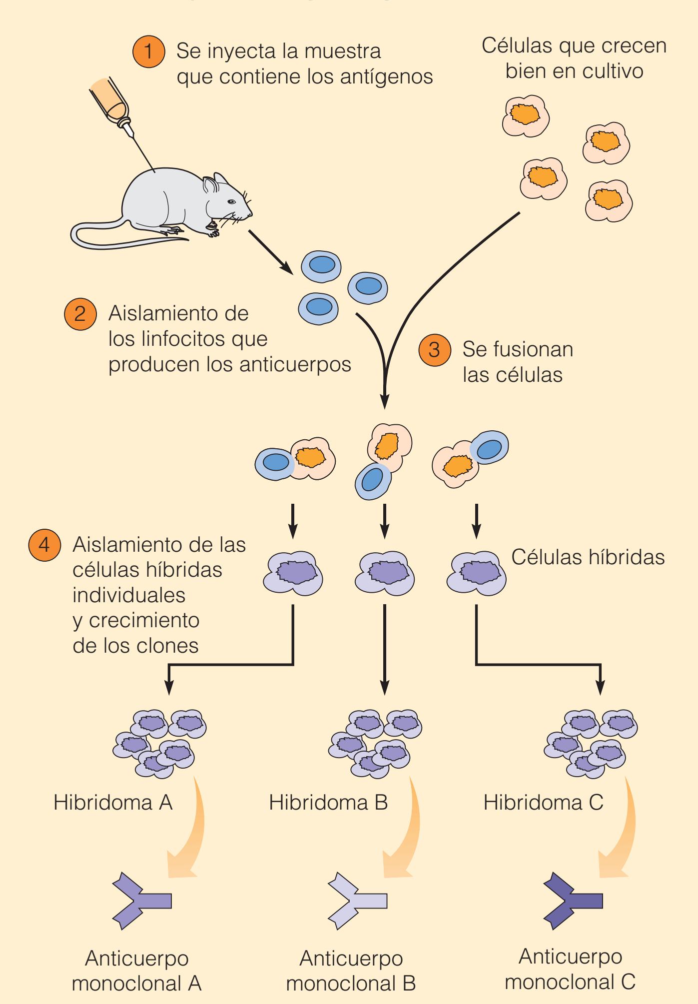


Figura 24B.1 La técnica del anticuerpo monoclonal. Este procedimiento produce poblaciones puras de moléculas de anticuerpo, cada una dirigida contra un único antígeno. ① Una muestra que contiene los antígenos de interés se inyecta en un ratón para estimular la formación de anticuerpos. ② Los linfocitos que producen los anticuerpos se aíslan del bazo del animal. ③ Los linfocitos aislados se fusionan con células que crecen bien en cultivo. ④ Las células híbridas individuales se aíslan y se hacen crecer para formar una serie de poblaciones celulares clonadas (hibridomas) que cada uno fabrica un único tipo de anticuerpo. Muchos de estos hibridomas producirán anticuerpos dirigidos a otros antígenos a los que se ha expuesto al animal, de manera que se requiere un extenso sistema de detección para encontrar el hibridoma que fabrica el anticuerpo dirigido contra el antígeno de interés.

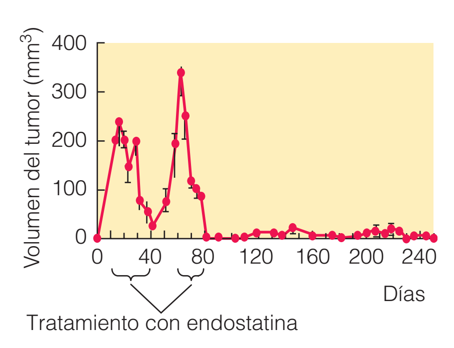


Figura 24.22 Tratando el cáncer para inhibir la angiogénesis. En este experimento, se permitió a las células cancerosas crecer durante diez días para formar un gran tumor en ratones. A estos ratones se les inyectó un inhibidor de la angiogénesis, endostatina, hasta que el tumor se reducía. Después de permitir que el tumor creciera otra vez en ausencia de endostatina, se daba un segundo ciclo del tratamiento. Después de que se detenía el segundo tratamiento, el tumor ya no crecía más. (Datos de Boehm, T., J. Folkman, T. Browder, y M. S. O´Reilly. *Nature* 390 [1997]: 404.)

Aplicar los resultados de los estudios en animales a los pacientes humanos cuesta muchos años de pruebas y hay varios obstáculos potenciales a superar. Primero, mucho de los primeros casos humanos con drogas anti-angiogénicas se realizaron en pacientes de cáncer con la enfermedad en estadios avanzados, y la terapia anti-angiogénica funciona mejor en etapas tempranas. Segundo, la dosis óptima para las drogas que inhiben la angiogénesis tiene que ser ajustadas a la medida de cada paciente basándose en la concentración de moléculas estimuladoras de la angiogénesis producidas por sus tumores. Y tercero, la efectividad de las drogas anti-cáncer normalmente se mide valorando su capacidad para hacer que el tumor se reduzca o desaparezca. Mientras que esto podría ser una expectativa apropiada para una droga que mata células cancerosas, inhibir el crecimiento de los vasos sanguíneos puede simplemente impedir que los tumores se hagan más grandes. Este estado, denominado *enfermedad estable*, representaría un resultado aceptable para las drogas anti-angiogénicas si le permiten vivir a los pacientes con cáncer con un estado de enfermedad crónico pero manejable, especialmente en vista de los mínimos efectos colaterales asociados al uso de tales drogas.

La complejidad que surge de estas cuestiones significa que costará muchos años evaluar la efectividad de las docenas de drogas anti-angiogénicas que de forma habitual se están probando en pacientes con cáncer. No obstante, los signos de progreso son ya evidentes. Por ejemplo, en 2004 la *Avastina* se convirtió en la primera droga anti-angiogénica aprobada para el uso médico rutinario en pacientes con cáncer. La Avastina es un anticuerpo monoclonal que se une e inactiva al factor de crecimiento estimulante de la angiogénesis, *VEGF*. En los tumores que dependen del VEGF para estimular la angiogénesis, se esperaría que la Avastina inhibiera la angiogénesis y que por tanto inhibiera el crecimiento del tumor. Los casos clínicos humanos han demostrado que los pacientes con cáncer de colon metastático que recibieron quimioterapia estándar con Avastina vivieron más tiempo que los pacientes que recibieron quimioterapia estándar sin Avastina. Tales resultados representan uno de los primeros signos de que la terapia anti-angiogénica puede un día convertirse en un componente integral del tratamiento del cáncer humano.

Perspectiva

El cáncer se define como una proliferación incontrolada de las células que son capaces de diseminarse por invasión y metástasis. En las poblaciones de células cancerosas el equilibrio entre la división celular y la diferenciación celular se altera, conduciendo a un aumento progresivo del número de células en división. Las células cancerosas son independientes de anclaje, menos susceptibles que las normales a la inhibición por contacto (dependiente de la densidad) y pueden reestructurar sus telómeros.

El mantenimiento del crecimiento del tumor requiere un aporte sanguíneo cuyo desarrollo se desencadena por un aumento en la producción de activadores de la angiogénesis y una disminución en la producción de los inhibidores de la angiogénesis. Después de desencadenar la angiogénesis, las células cancerosas invaden los tejidos circundantes, entran al sistema circulatorio y metastatizan en lugares alejados. La invasión se facilita por una disminución de la adhesión célula a célula, por un aumento de la motilidad y por la secreción de proteasas que degradan la matriz extracelular y la membrana basal. Sólo una pequeña fracción de las células cancerosas que entran en el torrente circulatorio sobrevive al viaje y establecen metástasis con éxito. Los lugares de las metástasis vienen determinados por la localización del primer lecho capilar así como por las condiciones órgano-específicas que influyen en el crecimiento de la célula cancerosa.

Una variedad de diferentes sustancias químicas, incluyendo aquellas que se encuentran en el humo del tabaco, pueden causar cáncer. Las sustancias químicas inducen el desarrollo del cáncer a través de un proceso multi-etapa que implica la iniciación, la promoción y la progresión del tumor. La iniciación está basada en las mutaciones del DNA, mientras que la promoción implica proliferación de las células iniciadas por un periodo de tiempo prolongado, acompañado de una selección gradual de células que muestran propiedades de crecimiento elevadas. Durante la progresión del tumor, las células adquieren mutaciones adicionales y sufren cambios en la expresión de los genes que producen células con rasgos aberrantes crecientes.

Los cánceres también pueden estar causados por radiaciones ionizantes o

por la luz del sol, ambos causan mutaciones en el DNA y por ciertos virus, bacterias y parásitos. Algunos virus que causan cáncer actúan desencadenando directamente la proliferación celular, bien a través de la acción de genes virales o alterando el comportamiento de los genes celulares. Otros agentes infecciosos crean la destrucción del tejido que indirectamente estimula la proliferación celular en condiciones en las que es posible dañar al DNA.

Los oncogenes son genes cuya presencia puede provocar cáncer. Mientras que a veces se introducen en las células por medio de virus, más a menudo surgen a partir de genes celulares normales (proto-oncogenes) por mutaciones puntuales, por amplificación génica, por translocación cromosómica, por reordenamientos locales de DNA o por mutagénesis insertacional. La mayoría de las proteínas producidas por los oncogenes son componentes de rutas de señalización, tales como factores de crecimiento, receptores, proteínas de unión a GTP de la membrana plasmática, proteínas quinasas no receptoras, factores de transcripción y reguladores del ciclo celular o de la muerte celular. Los oncogenes codifican formas anormales o cantidades excesivas de tales proteínas, conduciendo por tanto, a una estimulación excesiva de la proliferación.

Los genes supresores de tumores son genes cuya pérdida o inactivación puede conducir al cáncer. La susceptibilidad a desarrollar cáncer aumenta en personas que heredan genes supresores de tumores mutados. Hay tres genes supresores de tumores importantes: (1) El gen *RB*, que produce una proteína que impide el paso de la fase G1 a la fase S; (2) El gen *p53*, que produce una proteína que impide que las células con el DNA dañado proliferan; y (3) el gen *APC*, que produce una proteína que inhibe la ruta Wnt.

Los cánceres surgen a través de la acumulación de mutaciones por etapas que implican a dos oncogenes y a un gen supresor de tumores. La inestabilidad genética de las células cancerosas incluye defectos en los mecanismos de reparación del DNA, alteraciones en las rutas que desencadenan la apoptosis, y fallos en el mecanismo de ordenamiento de los cromosomas durante la mitosis.

Las técnicas de detección tales como el Papanicolaou, pueden prevenir las muertes por cáncer al detectar la enfermedad antes de que se disemine. El tratamiento del cáncer normalmente implica cirugía para eliminar el tumor primario, seguida si es necesario, por terapia de radiación y/o quimioterapia para matar o inhibir el crecimiento de cualquier célula cancerosa que quede. Entre los nuevos abordajes en los tratamientos se incluyen la inmunoterapia que explota la capacidad del sistema inmune para atacar a las células cancerosas, drogas marcadoras moleculares dirigidas a proteínas críticas para la célula cancerosa y agentes anti-angiogénicos que atacan a los aportes sanguíneos de los tumores.

Problemas

Los problemas de mayor dificultad están marcados con un •.

24.1 Células normales y células cancerosas. Se le dan dos tubos de ensayo que contienen muestras de células humanas. Una se obtuvo de un tumor maligno y otra de un tejido normal. Antes de que pueda empezar con sus estudios, las etiquetas se caen de los tubos y usted ya no puede saber la identidad de cada muestra. Describa por lo menos cuatro experimentos diferentes que realizaría para determinar qué muestra contiene las células cancerosas.

24.2 Angiogénesis. Suponga que el análisis de las células cancerosas descrito en el Problema 24.1 revela que produce grandes cantidades de angistatina.

(a) ¿Por qué podría pensar que estas células no procederían de un tumor grande?

(b) Si las células vienen de un gran tumor, ¿cómo se correlacionaría este hecho con su respuesta de la parte (a)?

24.3 ¿Cómo se disemina el cáncer? Describa las tres etapas principales implicadas en la metástasis, incluyendo una descripción de las propiedades celulares más relevantes.

•24.4 Ratas, cobayas y humanos. La sustancia química 2-acetilaminofluoreno (AAF) causa cáncer de vejiga cuando se inyecta en las ratas pero no en cobayas. Si las células de vejiga normales obtenidas de ratas y de cobayas se ponen en cultivo y se exponen a AAF, ninguna de ellas se convierte en célula cancerosa. ¿Cómo puede explicar estos resultados? Sugiere su explicación cómo predecir si el AAF es carcinógeno en humanos sin exponer a los humanos al AAF?

24.5 Oncogenes y genes supresores de tumores. Indique si cada una de las siguientes descripciones se ajusta a un oncogén (OG), a un proto-oncogén (PO) o a un gen supresor de tumores (TS). Algunas descripciones se pueden aplicar a más de uno de estos tipos de genes. Explique sus respuestas.

(a) En tipo de gen encontrado en células normales.

(b) Un gen que codificaría un factor de crecimiento normal.

(c) Un tipo de gen encontrado en las células cancerosas.

(d) Un tipo de gen encontrado sólo en células cancerosas.

(e) Un gen cuya presencia puede causar cáncer.

(f) Un gen cuya ausencia puede causar cáncer.

(g) Un tipo de gen que se puede encontrar tanto en células normales como en células cancerosas.

24.6 Niños de la luna. Los niños con xeroderma pigmentosum normalmente son incapaces de realizar la reparación de escisiones. Explique por qué esto les hace más susceptibles a desarrollar cáncer. Explique también porque la palabra «normalmente» está incluida en la primera frase.

•24.7 Detección del cáncer. La incidencia anual global del cáncer de colon en los Estados Unidos es actualmente de 55 casos por cada 100.000. Puesto que el cáncer de colon provoca normalmente sangrado, los médicos utilizan a veces un procedimiento denominado prueba de sangre fecal oculta (FOBT, del inglés, *fecal occult blood test*) para evaluar la presencia de pequeñas cantidades de sangre en las heces. Este

test tiene una especificidad del 98%, lo que significa que cuando indica la presencia de sangre en heces, el resultado es un error (es decir, el cáncer no está presente) sólo el 2% de las veces. Mientras que esto nos puede parecer una especificidad excelente, una tasa de un 2% de falsos positivos hace de la prueba del FOBT una herramienta casi inútil para hacer detecciones aleatorias de cáncer de colon en la población. ¿Por qué?

•**24.8 Los anticuerpos monoclonales y el linfoma.** Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno CD20 se usan habitualmente para tratar ciertas formas de linfoma. Sin embargo, el antígeno CD20 está presente tanto en los linfocitos normales como en los malignos, y el tratamiento con el anticuerpo además mata a las células normales tanto como a las células cancerosas. ¿Por qué piensa que este anticuerpo resulta todavía ser un tratamiento eficaz para el linfoma?

Bibliografía recomendada

Las referencias con importancia histórica están marcadas con •.

Referencias generales

Kleinsmith, L. J. *Principles of Cancer Biology*. San Francisco: Benjamin Cummings, 2006 (*in press*).

Proliferación celular incontrolada

Igney, F. H. y P. H. Krammer. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer* 2 (2002): 277.

Masters, J. R. HeLa cells 50 years on: the good, the bad, and the ugly. *Nature Reviews Cancer* 2 (2002): 315.

Neumann, A. A. y R. R. Reddel. Telomere maintenance and cancer—look, no telomerase. *Nature Reviews Cancer* 2 (2002): 879.

Ruoslahti, E. y J. C. Reed. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell* 77 (1994): 477.

Cómo se disemina el cáncer

Chambers, A. F., A. C. Groom y C. MacDonald. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer* 2 (2002): 563.

Feldman, M. y L. Eisenbach. What makes a tumor cell metastatic? *Sci. Amer.* 259 (noviembre de 1988): 60.

Ferrara, N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nature Reviews Cancer* 2 (2002): 795.

•Folkman, J. The vascularization of tumors. *Sci. Amer.* 234 (mayo de 1976): 58.

Ruoslahti, E. How cancer spreads. *Sci. Amer.* 275 (septiembre de 1996): 72.

¿Qué causa el cáncer?

•Ames, B. N., W. E. Durston, E. Yamasaki y F. D. Lee (1973). Carcinogens as mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70 (1973): 2281.

Leffell, D. J. y D. E. Brash. Sunlight and skin cancer. *Sci. Amer.* 275 (julio de 1996): 52.

Peek, R. M., Jr. y M. J. Blaser. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nature Reviews Cancer* 2 (2002): 28.

Peto, J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* 411 (2001): 390.

Proctor, R. N. Tobacco and the global lung cancer epidemic. *Nature Reviews Cancer* 1 (2001): 82.

Speck, S. H. EBV framed in Burkitt lymphoma. *Nature Medicine* 8 (2002): 1086.

Williams, D. Cancer after nuclear fallout: lessons from the Chernobyl accident. *Nature Reviews Cancer* 2 (2002): 543.

zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer* 2 (2002): 342.

Oncogenes y genes supresores de tumores

Hanahan, D. y R. A. Weinberg. The hallmarks of cancer. *Cell* 100 (2000): 57.

•Harris, H., G. Klein, P. Worst y T. Tachibana. Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature* 223 (1969): 363.

Jones, P. A. y S. B. Baylin. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews Genetics* 3 (2002): 415.

Lengauer, C., K. W. Kinzler y B. Vogelstein. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396 (1998): 643.

Malumbres, M. y M. Barbacid. *RAS* oncogenes: the first 30 years. *Nature Reviews Cancer* 3 (2003): 7.

Rowley, J. D. Chromosome translocations: dangerous liaisons revisited. *Nature Reviews Cancer* 1 (2001): 245.

Sherr, C. J. y F. McCormick. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2 (2002): 103.

Diagnóstico, detección y tratamiento

Allen, T. M. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2 (2002): 750.

Old, L. J. Immunotherapy for cancer. *Sci. Amer.* 275 (septiembre de 1996): 136.

Wulfkuhle, J. D., L. A. Liotta y E. F. Petricoin. Proteomic applications for the early detection of cancer. *Nature Reviews Cancer* 3 (2003): 267.





Principios y técnicas de microscopía

Los biólogos celulares a menudo necesitan examinar la estructura de las células y de sus componentes. El microscopio es una herramienta indispensable para ello ya que la mayoría de las estructuras celulares son demasiado pequeñas para ser observadas a simple vista. De hecho, los comienzos de la biología celular se pueden seguir hasta la invención del **microscopio óptico**, que posibilitó por primera vez a los científicos la observación de imágenes aumentadas de las células. El primer microscopio óptico fue desarrollado en 1590 por Z. Janssen y su sobrino H. Jansenn. Durante el siguiente siglo se describieron muchas observaciones microscópicas importantes, entre las que destacan las realizadas por Robert Hooke, que observó las primeras células y por Antonie van Leeuwenhoek, cuyos microscopios mejorados nos hicieron vislumbrar por primera vez la estructura interna de las células. Desde entonces, el microscopio óptico ha experimentado numerosas mejoras y modificaciones hasta la actualidad.

De igual forma que la invención del microscopio óptico permitió una oleada de logros científicos al posibilitar por primera vez la observación las células, el desarrollo del **microscopio electrónico** en la década de 1930 revolucionó nuestra capacidad de explorar la estructura y la función celular. En microscopio electrónico nos hizo pasar a una nueva era en biología celular debido a que es al menos 100 veces más eficaz que el microscopio óptico para visualizar objetos, abriendo nuestros ojos a la exquisita arquitectura subcelular, nunca observada anteriormente, y cambiando para siempre nuestra forma de pensar sobre las células.

Sin embargo, a pesar de su poder de resolución inferior, el microscopio óptico no ha caído en desuso. Por el contrario la microscopía óptica ha experimentado un renacimiento en los últimos años por el desarrollo de nuevas técnicas especializadas que han permitido a los investigadores explorar aspectos de la estructura y del comportamiento celular que no pueden ser estudiados mediante la microscopía electrónica. Estos avances han sido posibles por la combinación de tecnologías procedentes de la física, ingeniería, química y biología molecular, y han ampliado en gran medida nuestra capacidad para estudiar células empleando la microscopía óptica.

En este apéndice, exploraremos los principios fundamentales tanto de microscopía óptica como de microscopía electrónica, haciendo énfasis en las diversas técnicas especializadas que se emplean para adaptar estos dos tipos de microscopía para una gran diversidad de objetivos especializados.

Principios ópticos de la microscopía

Aunque los microscopios ópticos y electrónicos difieren en muchos aspectos, ambos hacen uso de principios ópticos semejantes para la formación de imágenes. Por lo tanto, comenzamos nuestra discusión sobre microscopía examinando estos principios comunes, y haciendo especial énfasis en los factores que determinan el tamaño mínimo de los objetos que pueden observarse.

La longitud de onda de la iluminación establece un límite en el tamaño de los objetos que pueden ser observados

Independientemente del tipo de microscopio que se emplee, se necesitan siempre tres elementos para formar una imagen: una *fuente de iluminación*, una *muestra* para ser examinada y un *sistema de lentes* que enfocan la iluminación sobre la muestra y que forma la imagen. La Figura A.1 ilus-

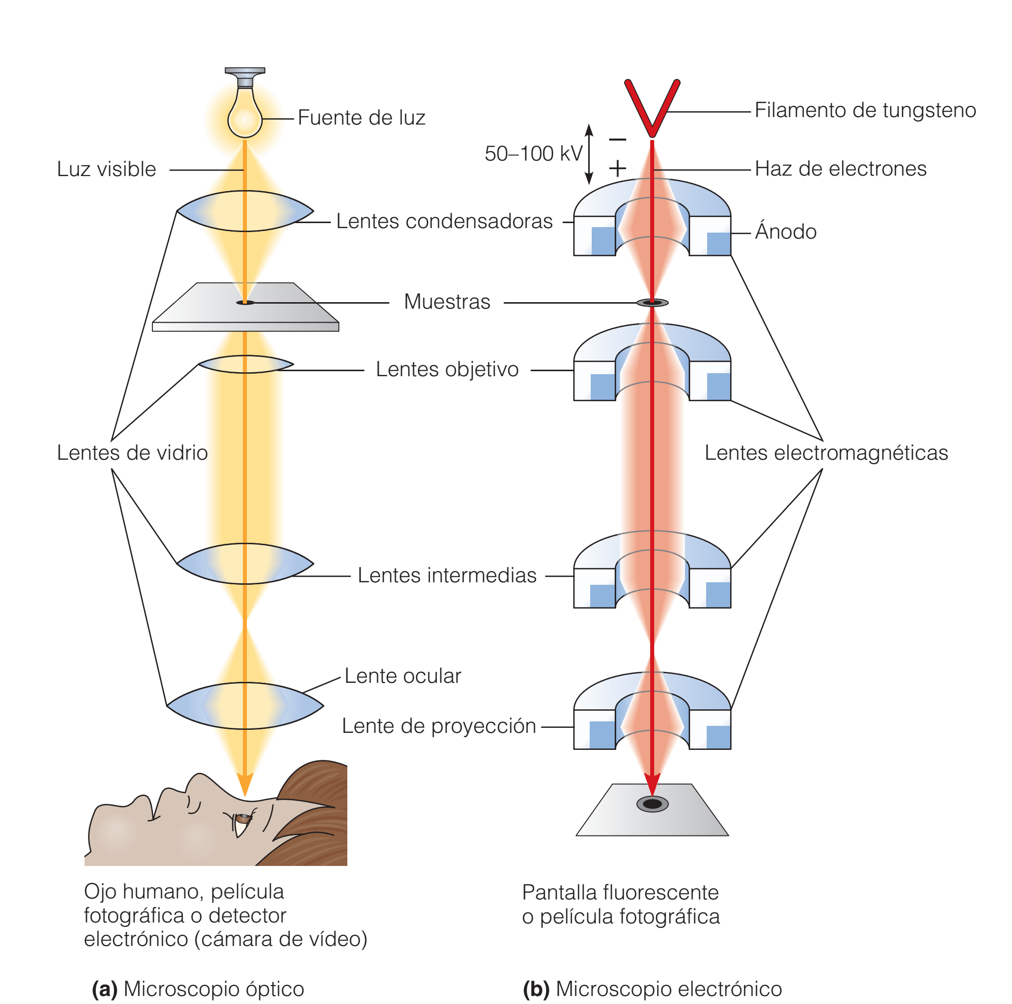


Figura A.1 Sistemas ópticos de los microscopios óptico y electrónico. El microscopio óptico utiliza luz visible y lentes de vidrio para formar a partir de la muestra una imagen que puede ser observada a simple vista, enfocada en una película fotográfica o recibida por un detector electrónico como una cámara de vídeo. (**b**) El microscopio electrónico utiliza un haz de electrones emitido por un filamento de tungsteno y enfocado por lentes electromagnéticas para formar una imagen de la muestra en una pantalla fluorescente, un detector digital o una película fotográfica. (Estos diagramas se han dibujado para enfatizar las semejanzas en el diseño general entre los dos tipos de microscopio. En realidad, el microscopio óptico está diseñado con la fuente de luz en la parte inferior y el ocular en la parte superior, como se muestra en la Figura 5b.)

tra estas características en un microscopio óptico y en un microscopio electrónico. En un microscopio óptico, la fuente de iluminación es *luz visible*, y el sistema de lentes consiste en una serie de lentes de vidrio. La imagen puede ser vista o bien directamente a través de un ocular o bien se puede enfocar sobre un detector como una película fotográfica o una cámara electrónica. En un microscopio electrónico, la fuente de iluminación es un *haz de electrones* emitido por un filamento de tungsteno calentado, y el sistema de lentes consiste en series de electroimanes. El haz de electrones se enfoca en una pantalla fluorescente, en una película fotográfica o es visualizada digitalmente empleando un detector.

A pesar de estas diferencias en la fuente de iluminación y en el diseño de los instrumentos, los dos tipos de microscopios dependen de los mismos principios ópticos, y forman imágenes de una manera similar. Cuando se coloca una muestra en el recorrido de un haz de luz o de electrones, las características físicas del haz cambian de forma que se crea una imagen que puede ser interpretada por el ojo humano o puede ser registrada por un detector fotográfico. Para comprender esta interacción entre la fuente de iluminación y la muestra, necesitamos entender el concepto de longitud de onda que se ilustra en la Figura A.2 empleando la siguiente analogía sencilla.

Si dos personas sujetan los dos extremos opuestos de una cuerda y la hacen ondular mediante un movimiento rítmico hacia arriba y hacia abajo, generarán un largo patrón regular de movimiento en la cuerda denominado movimiento ondulatorio (Figura A.2a). La distancia desde la cresta de una onda a la cresta de la siguiente se denomina **longitud de onda**. Si alguien localizado en un lado de la cuerda arroja hacia la cuerda un objeto grande como una pelota de playa, ésta puede interferir con el movimiento de la cuerda y perturbarlo (Figura A.2b). Sin embargo, si se arroja hacia la cuerda un pequeño objeto como una pelota de béisbol, el movimiento de la cuerda probablemente no se verá afectado (Figura A.2c). Si las personas que sujetan la cuerda la mueven más rápidamente, su movimiento todavía será ondulatorio, pero la longitud de onda será probablemente más corta (Figura A.2d). En este caso, si se arroja contra la cuerda una pelota de béisbol, es bastante probable que el movimiento de la cuerda se perturbe (Figura A.2e).

Esta analogía sencilla ilustra un principio importante: la capacidad de un objeto de perturbar un movimiento ondulatorio depende críticamente del tamaño del objeto con relación a la longitud de onda del movimiento. Este principio es de gran importancia en microscopía, ya que significa

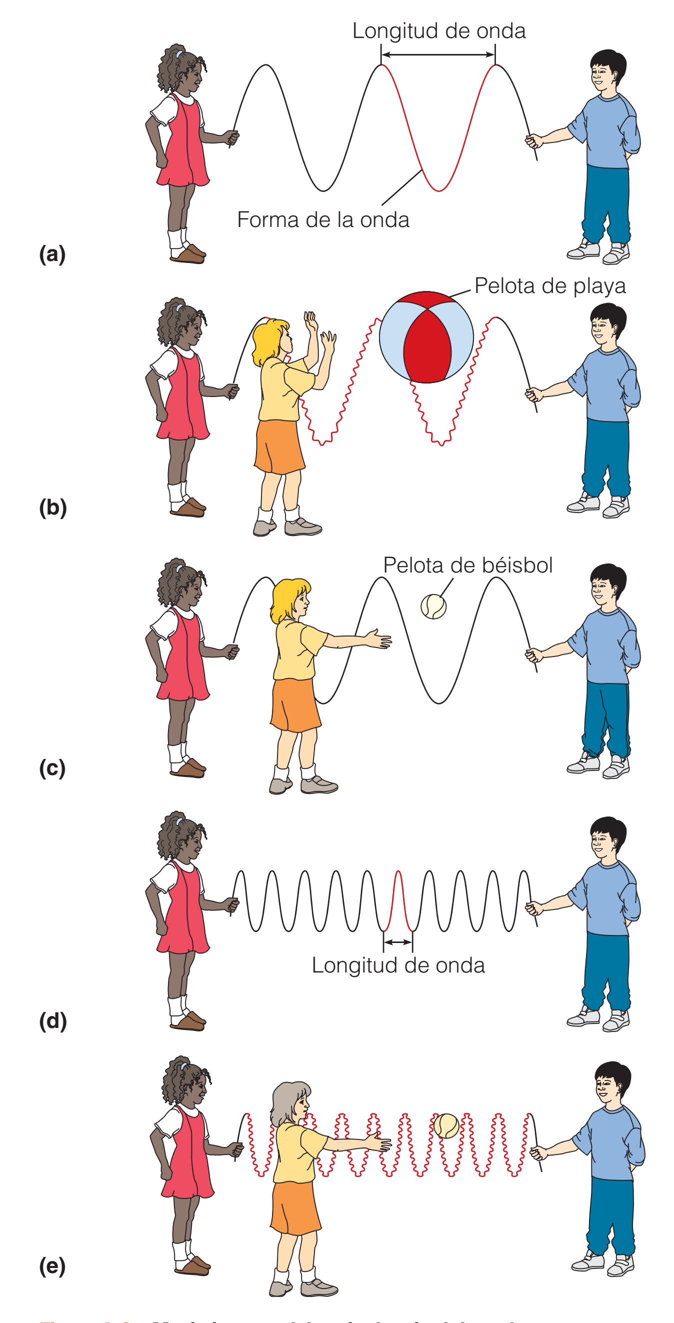


Figura A.2 Movimiento ondulatorio, longitud de onda y perturbaciones. El movimiento ondulatorio de una cuerda sujeta por dos personas es análogo al movimiento ondulatorio de los fotones y electrones, y se puede utilizar para ilustrar el efecto del tamaño de un objeto en su capacidad de perturbar el movimiento ondulatorio. (**a**) El movimiento rítmico del extremo de una cuerda hacia arriba y hacia abajo generará un movimiento ondulatorio con una longitud de onda característica. (**b**) Cuando se arroja contra la cuerda una pelota de playa u otro objeto con un diámetro comparable a la longitud de onda de la cuerda, se perturba el movimiento de la cuerda. (**c**) Una bola de béisbol u otro objeto con un diámetro significativamente menor que la longitud de onda de la cuerda producirá perturbaciones muy pequeñas o no perturbará el movimiento de la cuerda. (**d**) Si la cuerda se mueve más rápidamente, la longitud de onda se reduce sustancialmente. (**e**) Ahora, una pelota de béisbol puede perturbar el movimiento de la cuerda porque su diámetro es comparable a la longitud de onda de la cuerda.

que la longitud de onda de la fuente de iluminación establece el límite del tamaño mínimo de un objeto para poder ser observado. Para comprender esta relación, necesitamos reconocer que el movimiento de la cuerda de la Figura A.2 es análogo al rayo de luz (fotones) o de electrones que se emplea como fuente de iluminación en el microscopio óptico o electrónico respectivamente —en otras palabras, tanto la luz como los electrones se comportan como ondas—. Cuando un haz de luz o de electrones incide sobre una muestra, la muestra altera las características físicas del haz de iluminación de igual forma que la pelota de playa o de béisbol altera el movimiento de la cuerda. Debido a que un objeto sólo se puede detectar por su efecto sobre la onda, la longitud de onda debe tener un tamaño comparable al del objeto que debe ser detectado.

Una vez que entendemos esta relación entre la longitud de onda y el tamaño del objeto, podemos comprender ahora por qué los objetos muy pequeños sólo se pueden observar con el microscopio electrónico: la longitud de onda de los electrones es mucho más corta que la de los fotones. Así, algunos objetos como virus y ribosomas son demasiado pequeños para perturbar una onda de fotones pero pueden interaccionar con una onda de electrones. Al tiempo que describimos los distintos tipos de microscopios y de técnicas de preparación de muestras puede ser útil que se pregunte cómo interaccionan la fuente de iluminación y la muestra, y cómo se modifican las características de ambas para producir una imagen.

La resolución indica la capacidad para distinguir objetos adyacentes como objetos separados

Cuando un haz de luz o de electrones pasa a través de una lente y se enfoca en un punto, la imagen que se forma es consecuencia de una propiedad de las ondas denominada **interferencia** —proceso por el cual dos o más ondas se combinan para reforzarse o cancelarse, produciendo una onda igual a la suma de las dos ondas iniciales—. Así, la imagen que usted ve cuando observa una muestra a través de una serie de lentes es realmente un patrón de interacciones aditivas y destructivas de las ondas que atravesaron las lentes, un fenómeno conocido como **difracción**.

En un microscopio óptico se emplean lentes de vidrio para dirigir la dirección de los fotones, mientras que un microscopio electrónico emplea electroimanes como lentes para dirigir la dirección de los electrones. Aun así, los dos tipos de lentes tienen en común dos propiedades fundamentales: distancia focal y apertura angular. La **distancia focal** es la distancia entre el punto medio de la lente y el punto focal en el que convergen los rayos que atraviesan la lente (Figura A.3). La **apertura angular** es la mitad del ángulo α del cono de luz que entra en el objetivo del microscopio a partir de la muestra (Figura A.4). La apertura angular es por lo tanto una medida de la cantidad de iluminación que sale de la muestra y pasa través de la lente. Esto determina la

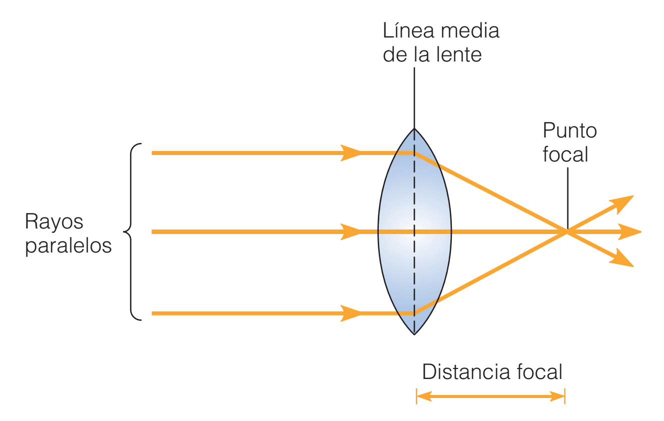


Figura A.3 Distancia focal de una lente. La distancia focal es la distancia desde la línea media de una lente al punto en el que convergen en un foco los rayos paralelos que pasan a través de la lente.

agudeza del patrón de interferencia y, por lo tanto, la capacidad de la lente para trasladar información de la muestra. En los mejores microscopios ópticos la apertura angular es alrededor de 70°.

La apertura angular de una lente es uno de los factores que determina la **resolución** de un microscopio, que se define como la distancia mínima que existe entre dos puntos que todavía se pueden identificar como puntos separados cuando se observan con un microscopio.

La resolución está determinada por tres factores: la longitud de onda de la luz que se emplea para iluminar la muestra, la apertura angular y el índice de refracción del medio que rodea a la muestra. (El **índice de refracción** es una medida de la variación de la velocidad de la luz al atravesar de un medio a otro.) El efecto de estas tres variables sobre la resolución se describe cuantitativamente mediante la siguiente ecuación conocida como la *ecuación de Abbé*:

$$r = \frac{0{,}61\lambda}{n \text{ sen } \alpha} \qquad \textbf{(A.1)}$$

en la que r es la resolución λ es la longitud de onda de la luz empleada como iluminación, n es el índice de refracción del medio entre la muestra y la lente objetivo del microscopio, y α esa apertura angular ya descrita. La constante 0,61 representa el grado en el que pueden solaparse los puntos de la imagen y todavía ser reconocidos como puntos separados por un observador.

En la ecuación anterior, la cantidad n seno de α se denomina **apertura numérica** de la lente objetivo y se abrevia como ***NA***. Por lo tanto, una expresión alternativa para la resolución sería:

$$r = \frac{0{,}61\lambda}{NA} \qquad \textbf{(A.2)}$$

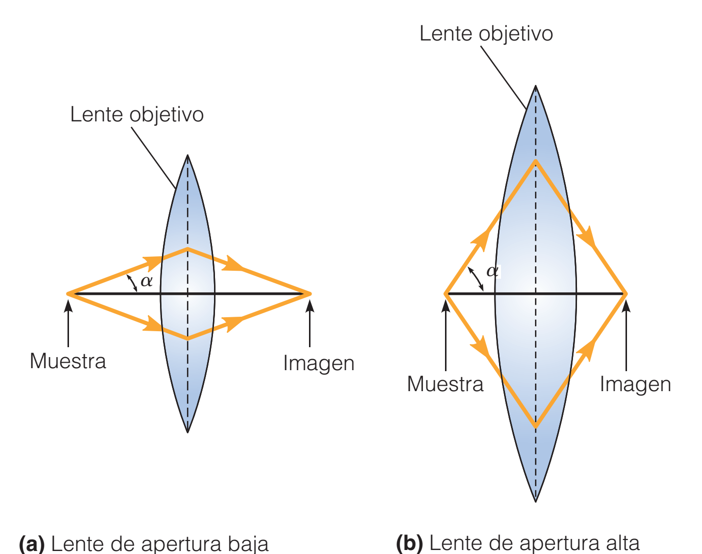


Figura A.4 Apertura angular de una lente. La apertura angular es la mitad del ángulo α del cono de luz que entra en la lente objetivo del microscopio a partir de la muestra. **(a)** Lente de poca apertura (α es pequeño). **(b)** Lente de apertura grande (α es grande). A mayor apertura numérica más información puede transmitir la lente. Las mejores lentes de vidrio pueden tener una apertura angular de alrededor de 70°.

En la práctica, el límite de resolución es de 200 nm para el microscopio óptico y 2 nm para el microscopio electrónico

Maximizar la resolución es una tarea importante tanto en microscopía óptica como electrónica. Ya que r es una medida de cómo de cerca pueden estar dos puntos y ser todavía distinguidos, la resolución mejora al tiempo que r se hace más pequeño. Así, para una mejor resolución, el numerador de la Ecuación A.2 debería ser lo más pequeño posible y el denominador lo más grande posible.

Comenzaremos preguntándonos cómo maximizar la resolución de una lente de vidrio usando luz como fuente de iluminación. En primer lugar, necesitamos hacer el numerador lo más pequeño posible. La longitud de onda para la luz visible oscila en el rango de 400-700 nm, por lo que el valor mínimo para λ vendrá determinado por la longitud de onda más corta, dentro de este rango, que sea práctica como fuente de iluminación lo que resulta ser luz azul de alrededor de 450 nm. Para maximizar el denominador de la Ecuación A.2, recuerde que la apertura numérica es el producto del índice de refracción y el seno de la apertura angular. Estos dos valores deben por lo tanto ser maximizados para alcanzar una resolución óptima. Ya que la apertura angular para los mejores objetivos es alrededor de 60°, el valor máximo para seno de α es alrededor de 0,94. El índice de refracción para el aire es de aproximadamente 1,0, por lo que para una lente diseñada para usarse en seco, la apertura numérica máxima es de alrededor de 0,94.

Así, para una lente con apertura angular de 70°, la resolución para una muestra iluminada en seco con luz azul de 450 nm se puede calcular de la manera siguiente:

$$r = \frac{0{,}61\lambda}{NA}$$

$$= \frac{(0{,}61)(450)}{0{,}94} = 292 \text{ nm} \qquad \textbf{(A.3)}$$

Por tanto, como regla básica, el límite de resolución para una lente de vidrio en seco es aproximadamente 300 nm.

Con objeto de incrementar la apertura numérica, algunas lentes de microscopio están diseñadas para utilizar *aceite de inmersión* entre la lente en la muestra. El aceite de inmersión tiene un índice de refracción mayor que el aire y, por tanto, permite que la lente reciba mayor cantidad de luz transmitida a través de la muestra. Debido a que el índice de refracción del aceite de inmersión es alrededor de 1,5, la apertura numérica máxima para una lente de aceite de inmersión es alrededor de $1{,}5 \times 0{,}94 = 1{,}4$. Por lo tanto, la resolución de una lente para aceite de inmersión es de alrededor de 200 nm.

$$r = \frac{0{,}61\lambda}{NA}$$

$$= \frac{(0{,}61)(450)}{1{,}4} = 196 \text{ nm} \qquad \textbf{(A.4)}$$

Así, el **límite de resolución** (la mejor resolución posible) para un microscopio que emplea luz visible es aproximadamente 300 nm en seco y de 200 nm con lentes para aceite de inmersión. La resolución puede ser optimizada hasta valores de 100 nm empleando luz ultravioleta como fuente de iluminación, debido a la longitud de onda más corta (200-300 nm) de ese tipo de luz. Sin embargo, la imagen debe ser entonces registrada en una película fotográfica o mediante algún otro medio de detección ya que la luz ultravioleta no es visible para el ojo humano. Además, el vidrio corriente es opaco a la luz ultravioleta, por lo que se deben emplear lentes de cuarzo muy caras. En cualquier caso, los valores que hemos calculado son los límites teóricos de resolución. En la práctica, es raro alcanzar estos límites debido a las aberraciones (defectos técnicos) de las lentes.

Debido a que el límite de resolución determina la capacidad de una lente para distinguir entre dos objetos que están muy próximos, también establece el límite superior de los aumentos útiles posibles con cualquier lente. En la práctica, los mayores aumentos útiles que se pueden conseguir con un microscopio óptico son de alrededor de 1.000 veces la apertura numérica de la lente empleada. Ya que la apertura numérica varía entre 1,0 y 1,4, esto significa que los aumentos útiles de un microscopio óptico están limitados aproximadamente a 1.000× en seco y a 1.400× con aceite de inmersión. Los aumentos por encima de estos límites se denominan «aumentos vacíos» ya que no proporcionan información adicional acerca del objeto que se estudia.

La forma más efectiva de alcanzar más aumentos es cambiar la fuente de iluminación de luz visible a electrones. Debido a que la longitud de onda de un electrón es alrededor de 100.000 veces más pequeña que la de un fotón de luz visible, el límite teórico de resolución de un microscopio electrónico (0,002 nm) es algunos órdenes de magnitud menor que el del microscopio óptico (200 nm). Sin embargo, algunos problemas prácticos en el diseño de las lentes electromagnéticas empleadas para enfocar los electrones evitan que el microscopio electrónico alcance este valor teórico. El principal problema es que los electroimanes producen distorsiones considerables cuando la apertura numérica es mayor de algunas décimas de grado. Este ángulo diminuto es varios órdenes de magnitud más pequeño que el de una lente de vidrio de buena calidad (alrededor de 70°), lo que confiere al microscopio electrónico una apertura numérica considerablemente más pequeña que la del microscopio óptico. El límite de resolución para el mejor microscopio electrónico es por lo tanto únicamente de alrededor de 0,2 nm, lejos del límite teórico de 0,002 nm. Además, cuando se observan muestras biológicas, existen problemas con la preparación de la muestra y con el contraste, que hacen que el límite práctico de resolución sea a menudo en torno a 2 nm. En la práctica, la resolución de un microscopio electrónico es generalmente 100 veces mejor que la de un microscopio óptico. Como resultado, los aumentos útiles de un microscopio electrónico son alrededor de 100 veces los de un microscopio óptico, es decir, alrededor de 100.000×.

El microscopio óptico

El microscopio óptico abrió inicialmente nuestros ojos a la existencia de las células. Un nombre pionero en la historia de la microscopía óptica es el de Antonie van Leeuwenhoek, el comerciante holandés reconocido generalmente como el padre de la microscopía óptica. Las lentes de Leeuwenhoek, que él mismo fabricó durante los últimos años del siglo XVII, tenían una calidad sorprendentemente alta para aquella época y eran capaces de aumentar 300 veces, lo que supone una mejora de 10 veces con respecto a los instrumentos previos. Este incremento en la capacidad de aumentar hizo visible por primera vez el interior de las células y las observaciones de Leeuwenhoek durante más de 25 años condujeron al descubrimiento de las células en varios tipos de muestras biológicas y establecieron el escenario para la formulación de la teoría celular.

Los microscopios compuestos emplean combinaciones de varias lentes

Se han hecho avances considerables en la construcción y la aplicación de microscopios ópticos en los 300 años posteriores al trabajo pionero de Leeuwenhoek. En la actualidad, el instrumento de elección en microscopía óptica utiliza combinaciones de diversas lentes y se denomina por lo tanto microscopio compuesto (Figura A.5). En la Figura A.5 se ilustra el recorrido de la luz en un microscopio compuesto

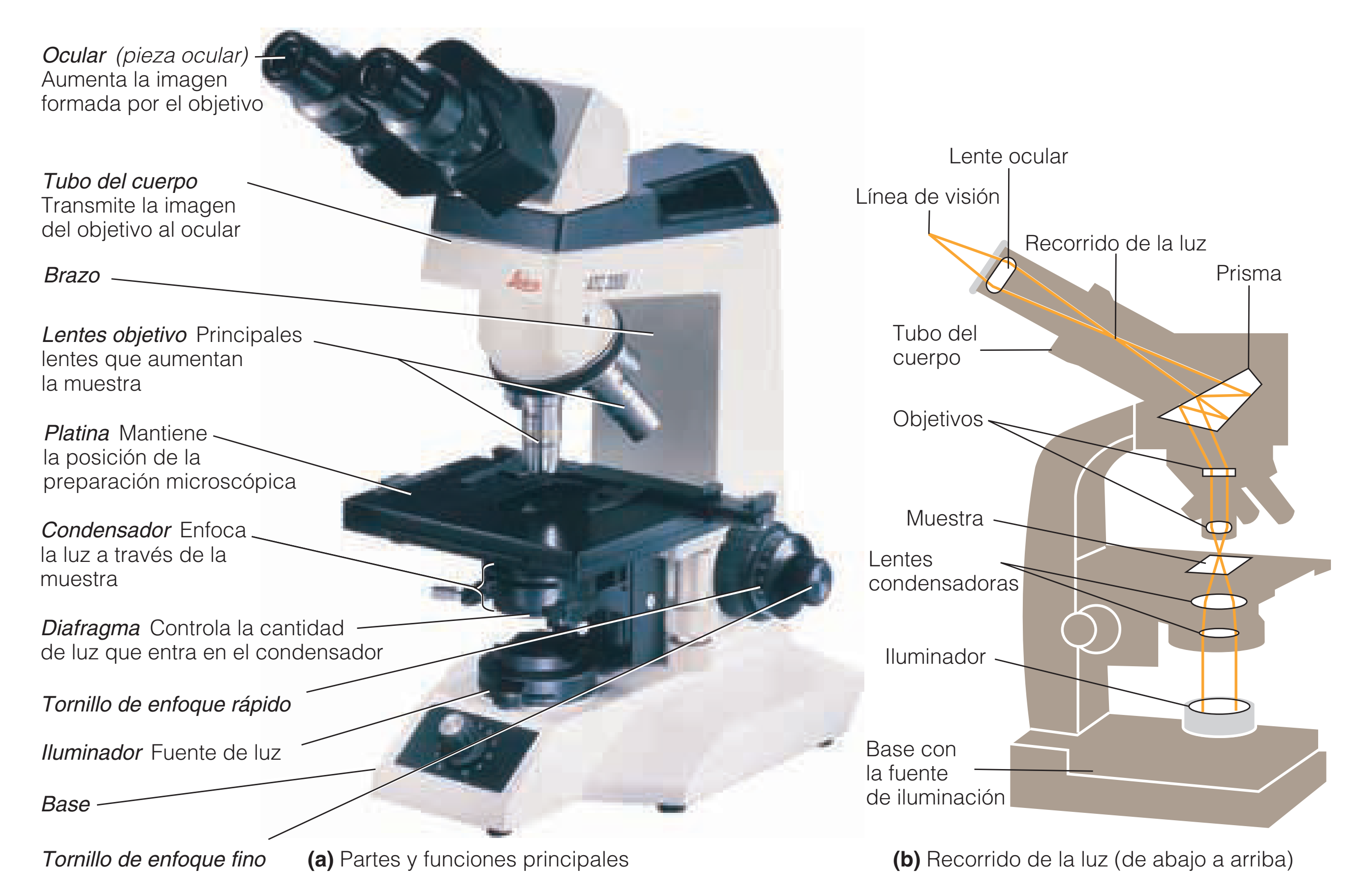


Figura A.5 Microscopio óptico compuesto. (**a**) Un microscopio óptico compuesto. (**b**) Recorrido de la luz a través del microscopio compuesto.

que comienza con la fuente de iluminación, normalmente una fuente de luz localizada en la base del instrumento. Los rayos de luz procedentes de esta fuente pasan a través de **lentes condensadoras** que dirigen la luz hacia la muestra montada en un portaobjetos de vidrio dispuesto en la **platina** del microscopio. La **lente objetivo**, localizada inmediatamente sobre la muestra, es responsable de la formación de la *imagen primaria*. La mayoría de microscopios compuestos tienen diversos objetivos de distintos aumentos montados sobre un revólver rotatorio.

La imagen primaria es posteriormente aumentada por la **lente ocular**, o pieza ocular. En algunos microscopios entre el objetivo y el ocular se posiciona una **lente intermedia** para conseguir aún más aumentos. Los aumentos totales de la imagen se pueden calcular multiplicando los aumentos del objetivo, del ocular y de la lente intermedia (si está presente). Así, un microscopio con un objetivo de 10×, una lente intermedia de 2,5×, y un ocular de 10×, aumentará 250 veces la muestra.

Los elementos del microscopio descritos hasta ahora constituyen la forma básica de microscopía óptica denominada **microscopía de campo claro**. En microscopio de campo claro, comparado con otros microscopios, es barato y fácil de usar y alinear. Sin embargo, las únicas muestras que se pueden observar directamente mediante microscopía de campo claro son aquellas que tienen color o tienen alguna otra propiedad que afecta a la luz que la atraviesa. Muchas muestras biológicas carecen de esas características y por lo tanto deben ser teñidas con colorantes o examinadas con tipos especiales de microscopios. Estos microscopios específicos tienen varias ventajas que los adecuan para visualizar distintos tipos de muestras. Entre ellos se incluyen la microscopía de contraste de fase, la microscopía de contraste de interferencia diferencial, la microscopía de fluorescencia y la microscopía confocal. En las siguientes secciones estudiaremos éstas y otras técnicas importantes.

La microscopía de contraste de fases detecta diferencias en el índice de refracción y en el grosor

Como describiremos más adelante con mayor detalle, antes de poder examinar las células mediante microscopía de campo claro, éstas habitualmente se matan, se cortan en secciones finas y se tiñen. Aunque estos procedimientos son útiles para visualizar los detalles de la arquitectura celular interna, el estudio de células que se han fijado, seccionado y teñido proporciona poca información acerca de los aspectos dinámicos del comportamiento celular. Por lo tan-

to, se han desarrollado una amplia variedad de técnicas para el uso de microscopía óptica en la observación de células que están intactas y en muchos casos todavía vivas. Una de estas técnicas, la **microscopía de contraste de fases**, incrementa contraste sin necesidad de cortar ni teñir, haciendo uso de las diferencias de grosor y de índice de refracción de varias regiones de las células que se examinan. Para entender las bases de la microscopía de contraste de fase debemos primero saber que un haz de luz está compuesto por multitud de rayos individuales de luz. A medida que los rayos pasan desde la fuente de luz a través de la muestra, su velocidad puede verse afectada por las propiedades físicas de la muestra. Habitualmente, la velocidad de los rayos se ve disminuida de manera variable por distintas regiones de la muestra, lo que produce un cambio de fase con relación a las ondas de luz que no han atravesado el objeto (se dice que en las ondas de luz viajan *en fase* cuando coinciden las crestas y los valles de las ondas).

Aunque el ojo humano no puede detectar directamente estos cambios de fase, la microscopía de contraste de fase soluciona este problema transformando las diferencias de fase en alteraciones del brillo. Esta conversión se consigue usando una *placa de fase* (Figura A.6) que es un componente óptico dispuesto en el recorrido de la luz por encima del objetivo para poner en fase los rayos directos no difractados con aquellos que han sido difractados por la muestra. El patrón resultante de longitudes de onda intensifica la imagen, produciendo una imagen con alto contraste entre zonas claras y oscuras sobre un fondo iluminado homogéneamente (Figura A.7). Como resultado, las estructuras internas en las células se visualizan a menudo mejor mediante microscopía de contraste de fase que con óptica de campo claro.

Esta modalidad en microscopía óptica es particularmente útil para examinar muestras vivas y sin teñir ya que los materiales biológicos producen difracción de la luz de manera casi inevitable. La microscopía de contraste de fase se emplea generalmente en microbiología y en la investigación con cultivos celulares para detectar bacterias, orgánulos celulares y otras pequeñas partículas presentes en las muestras vivas.

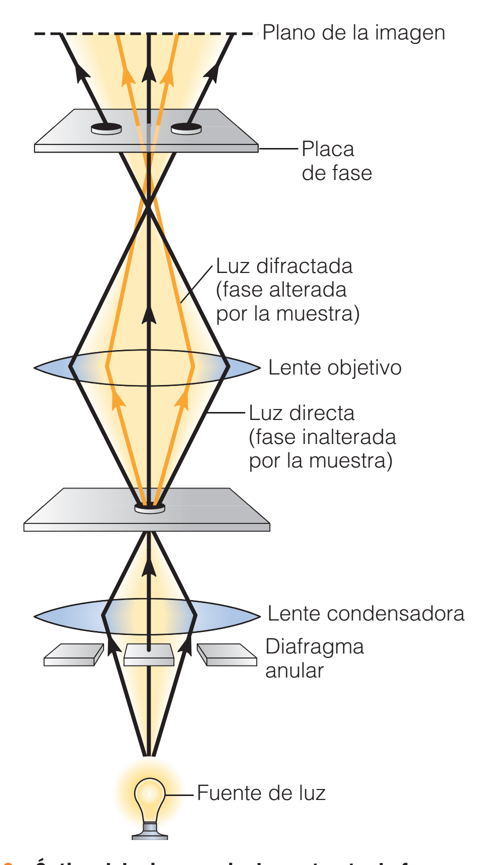


Figura A.6 Óptica del microscopio de contraste de fase. Configuración de los elementos ópticos y de los recorridos de los rayos de luz a través del microscopio de contraste de fase. Las líneas rosas representan la luz difractada por la muestra y las líneas negras representan la luz directa.

La microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC) utiliza un disociador del haz de luz para detectar diferencias de fase

La microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC) en principio se asemeja a la microscopía de contraste de fase, pero es más sensible ya que emplea un prisma especial para separar el haz de luz en dos rayos separados (Figura A.8). Cuando los dos haces se recombinan, cualquier cambio de fase en alguno de ellos producido al pasar a través de la muestra genera una interferencia con el segundo haz. Debido a que los principales cambios de fase normalmente se producen en los bordes de las células (el índice de refracción es más constante dentro de la célula), la periferia de la célula produce generalmente una señal intensa. La imagen tiene apariencia tridimensional como resultado de una ilusión de fusión de sombras que se produce ya que las

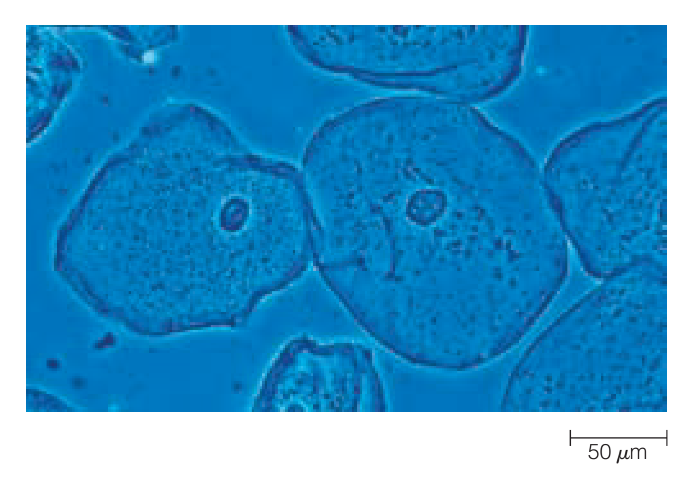


Figura A.7 Microscopía de contraste de fase. Micrografía de contraste de fase de células epiteliales. Las células fueron observadas sin procesar y sin teñir, lo que es una ventaja principal de la microscopía de contraste de fase.

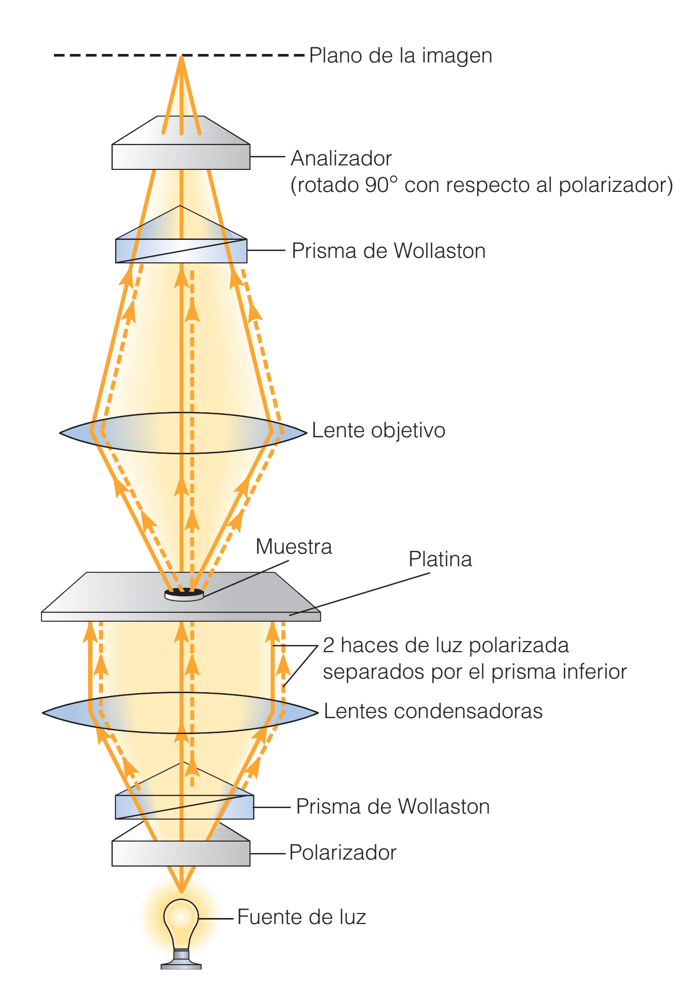


Figura A.8 Óptica del microscopio de contraste de interferencia diferencial (DIC). Configuración de los elementos ópticos y de los recorridos de los rayos de luz a través del microscopio DIC.

diferencias de fase son positivas en un lado de la cebra y negativas en el lado opuesto (Figura A.9).

Los componentes ópticos necesarios para la microscopía DIC incluyen un *polarizador*, un *analizador* y un par de *prismas de Wollaston* (Figura A.8). El polarizador y el primer prisma de Wollanston separan el rayo de luz, creando dos haces separados por una pequeña distancia en una dirección. Después de atravesar la muestra, los haces se recombinan por el segundo prisma de Wollanston. Si no existe muestra, los haces se recombinan para formar un rayo idéntico al que entró inicialmente en el polarizador y en el primer prisma de Wollanston. En presencia de una muestra, los dos haces no se recombinan de la misma forma (interfieren entre ellos), y la polarización de los haces rota ligeramente en comparación con el original. El efecto neto es un marcado incremento de la resolución, que hace que esta técnica sea especialmente útil para estudiar muestras vivas y sin teñir. Como veremos en breve, la combinación esa técnica con la videomicroscopía es una aproximación especialmente efectiva para estudiar los procesos dinámicos de las células en tiempo real.

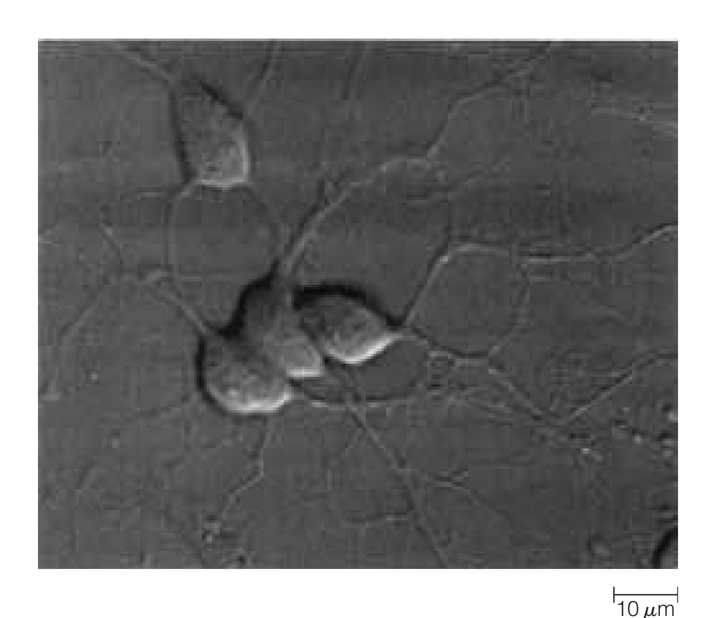


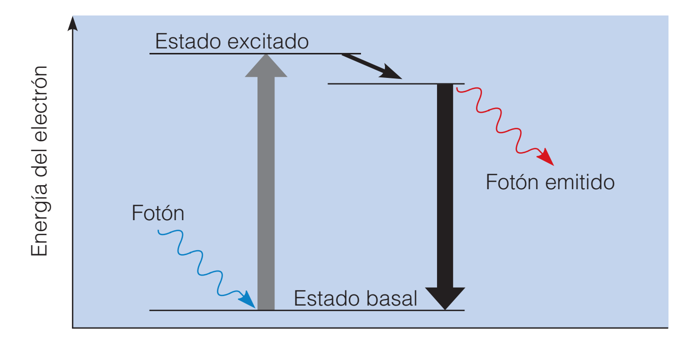
Figura A.9 Microscopía DIC. Micrografía DIC de un grupo de neuronas hipocampales de rata creciendo en cultivo. Obsérvese el efecto de grabado de sombra que hace que estas células aparezcan oscuras en la parte superior y claras en la parte inferior.

Los biólogos celulares emplean otros métodos de mejora de contraste. La *modulación de contraste de Hoffman*, desarrollada por Robert Hoffman, incrementa el contraste detectando gradientes ópticos a través de una muestra transparente, utilizando filtros especiales y un polarizador que rota. La modulación de contraste de Hoffman produce un efecto de fusión de sombras parecido al de la microscopía DIC.

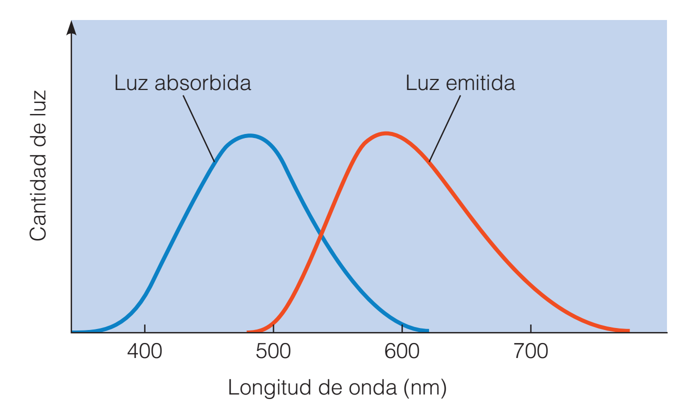
La microscopía de fluorescencia permite detectar la presencia de moléculas o iones específicos dentro de las células

Aunque las técnicas microscópicas descritas hasta ahora son bastante efectivas para visualizar las estructuras celulares, proveen relativamente poca información acerca de la localización de moléculas específicas. Una forma de obtener esta información es mediante el uso de **la microscopía de fluorescencia**, que permite la localización de moléculas fluorescentes dentro de las células. Para entender cómo funciona la microscopía de fluorescencia es necesario primero comprender el fenómeno de la fluorescencia.

Naturaleza de la fluorescencia. El término **fluorescencia** hace referencia al proceso que comienza con la absorción de luz por una molécula y termina con su emisión. La aproximación a este proceso se optimiza considerando el comportamiento de un cuanto de luz en contraposición a su comportamiento ondulatorio. La Figura A.10 es un diagrama de los diversos niveles de energía de un átomo simple. Cuando un átomo absorbe un fotón (o *cuanto*) de luz de una determinada energía, uno de sus electrones salta de su



(a) Diagrama de energía



(b) Espectros de absorción y de emisión

Figura A.10 Principios de la fluorescencia. (**a**) Diagrama de energía de la fluorescencia de un átomo simple. La luz de una determinada energía es absorbida (línea azul). El electrón salta de su estado basal a un estado excitado. Vuelve al estado basal emitiendo un fotón de menor energía y por lo tanto de mayor longitud de onda (por ejemplo, luz roja). (**b**) Espectros de absorción y de emisión de una molécula fluorescente típica. La curva azul representa la cantidad de energía absorbida en función de la longitud de onda, y la curva arroja muestra la cantidad de luz emitida como función de la longitud de onda.

estado basal un estado *excitado* o de mayor energía. Este electrón a menudo pierde parte de su energía y desciende a su estado basal original, emitiendo un fotón al hacerlo. El fotón emitido tiene siempre menor energía (mayor longitud de onda) que el fotón original que fue absorbido. Así, por ejemplo, la iluminación con luz azul de un átomo puede producir la emisión de luz roja (la energía de un fotón es inversamente proporcional a su longitud de onda; por lo tanto, la luz roja, al tener una longitud de onda mayor que la luz azul, tiene menor energía).

Las moléculas fluorescentes en realidad tienen diagramas de energía más complicados que los que se muestran en la Figura A.10a. El número de niveles posibles de energía en las moléculas reales es mucho mayor y por lo tanto, los diferentes tipos de energía que se puedan absorber y emitir son consecuentemente más numerosos. En la Figura A.10b se muestran los espectros de absorción y emisión de una molécula fluorescente típica. Cada molécula fluorescente tiene su propio espectro de absorción y de emisión característico.

El microscopio de fluorescencia. La microscopía de fluorescencia es un tipo especializado de microscopía óptica que emplea luz para excitar fluorescencia en la muestra. Un microscopio de fluorescencia tiene un *filtro de excitación* entre la fuente de luz y el condensador, que transmite únicamente luz de una longitud de onda particular (Figura A.11). El condensador enfoca la luz sobre la muestra, produciendo que los compuestos fluorescentes de la muestra emitan luz de una longitud de onda más larga. Tanto la luz de excitación del iluminador como la luz emitida, generada por los compuestos fluorescentes de la muestra, pasan a través del objetivo. A medida que la luz pasa a través del tubo del

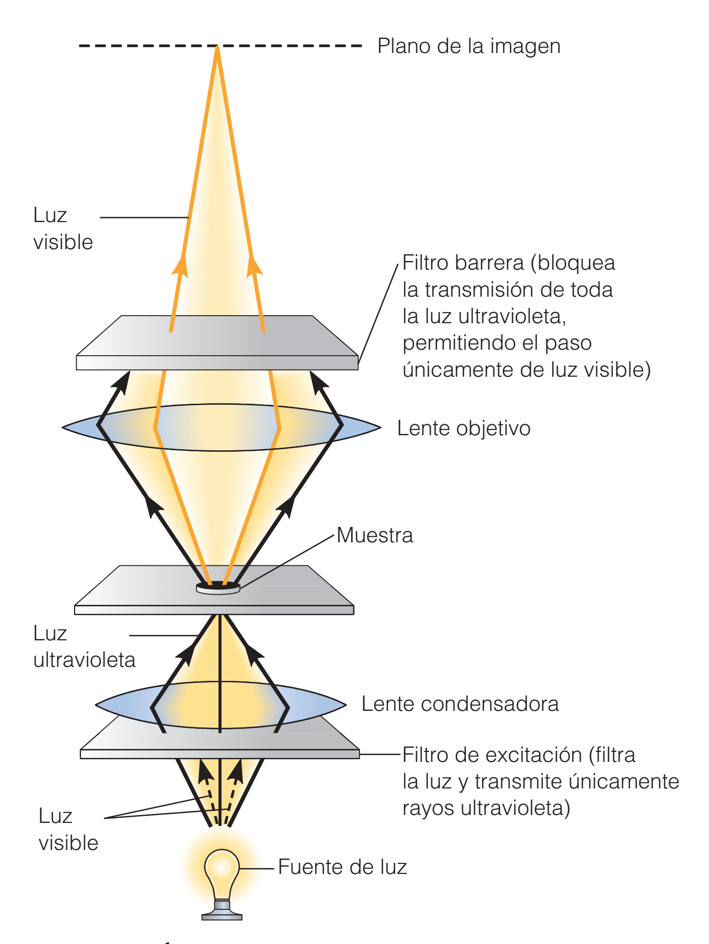


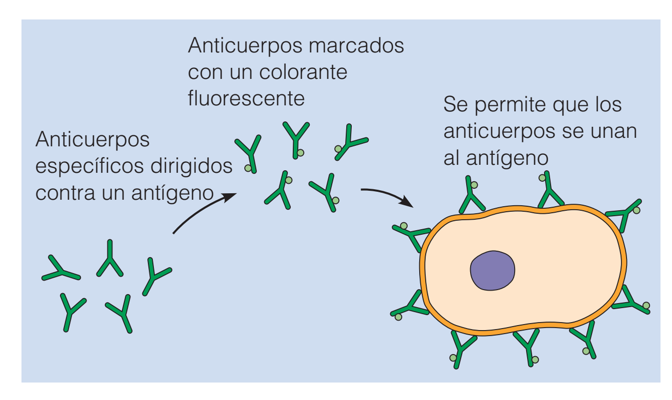
Figura A.11 Óptica del microscopio de fluorescencia. Configuración de los elementos ópticos y de los recorridos de la luz a través del microscopio de fluorescencia. La luz procedente de la fuente de iluminación pasa a través de un filtro de excitación que transmite únicamente luz de excitación (líneas negras continuas). La iluminación de la muestra con esta luz produce que sus moléculas fluorescentes emitan luz de una longitud de onda mayor (líneas azules). Posteriormente, el filtro barrera elimina la luz de excitación y permite el paso de la luz emitida. Por lo tanto, la imagen se forma exclusivamente a partir de luz emitida por las moléculas fluorescentes de la muestra.

microscopio por encima del objetivo, atraviesa un *filtro barrera* que elimina específicamente la longitud de onda de la luz de excitación. Esto deja únicamente las longitudes de onda de la luz emitida por la muestra para la formación de la imagen fluorescente final que, por lo tanto, parece brillante frente a un fondo oscuro.

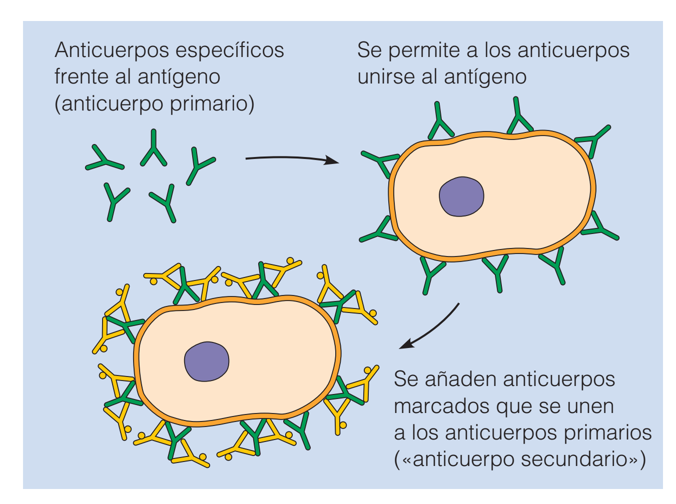
Anticuerpos fluorescentes. Para emplear la microscopía de fluorescencia en la localización de moléculas o iones específicos dentro de las células, los investigadores deben emplear indicadores especiales de las moléculas denominados *sondas fluorescentes*. Una sonda fluorescente es una molécula capaz de emitir luz fluorescente y que puede emplearse para indicar la presencia de una molécula o un ion específico.

Una de las aplicaciones más frecuentes de las sondas fluorescentes es la **inmunotinción**, una técnica basada en la capacidad de los anticuerpos de reconocer y unirse a moléculas específicas (las moléculas a las que se unen los anticuerpos se denominan *antígenos*). Los anticuerpos son proteínas producidas de manera natural por el sistema inmune en respuesta a la presencia de microorganismos invasores, pero se pueden generar también en el laboratorio inyectando una proteína extraña u otra macromolécula a un animal como un conejo o un ratón. De esta forma, es posible producir anticuerpos que se unirán selectivamente a virtualmente cualquier proteína que un científico quisiese estudiar. Los anticuerpos no son visibles directamente usando microscopía óptica, sin embargo, se suelen unir a colorantes fluorescentes como la *fluoresceína*, que emite fluorescencia verde, o la *rodamina*, que emite fluorescencia roja. Más recientemente los anticuerpos se han unido a «*quantum dots*» que son cristales diminutos que emiten luz y que son más estables químicamente que los colorantes tradicionales. Para identificar la localización subcelular de una proteína específica las células se tiñen simplemente con un anticuerpo fluorescente dirigido contra la proteína y la localización de la fluorescencia se detecta mediante el examen de la célula con luz de la longitud de onda apropiada.

Se pueden aplicar técnicas microscópicas de inmunofluorescencia usando anticuerpos marcados directamente con marcadores fluorescentes (Figura A.12a). Sin embargo, la microscopía de inmunofluorescencia se emplea más comúnmente utilizando técnicas de **inmunofluorescencia indirecta** (Figura A.12b). En la inmunofluorescencia indirecta se trata un tejido o una célula con un anticuerpo sin marcar. Este anticuerpo, llamado *anticuerpo primario*, se une a los sitios antigénicos específicos dentro del tejido o de la célula. Entonces se añade un segundo tipo de anticuerpo llamado *anticuerpo secundario*. El anticuerpo secundario está marcado con una partícula fluorescente y se une al anticuerpo primario. Debido a que se pueden unir más de una molécula de anticuerpo primario al antígeno, y más de una molécula de anticuerpo secundario al anticuerpo primario, se concentra una mayor cantidad de moléculas fluorescentes cerca de la molécula que queremos detectar. Como



(a) Inmunofluorescencia



(b) Inmunofluorescencia indirecta

Figura A.12 Inmunotinción empleando anticuerpos fluorescentes. La microscopía de inmunofluorescencia se basa en el uso de anticuerpos marcados con fluorescencia para detectar componentes moleculares específicos (antígenos) dentro de una muestra de tejido. (**a**) En la inmunofluorescencia directa un anticuerpo que se une a un componente molecular en la muestra de tejido se marca con un colorante fluorescente. El anticuerpo marcado entonces se añade a la muestra de tejido uniéndose a algunas localizaciones específicas. El patrón de fluorescencia que se origina se visualiza empleando microscopía de fluorescencia o confocal. (**b**) En la inmunofluorescencia indirecta, se añade un anticuerpo primario al tejido. A continuación se añade un anticuerpo secundario que lleva el marcaje fluorescente. El anticuerpo secundario se une al anticuerpo primario. Debido a que se puede unir más de un anticuerpo secundario fluorescente a cada molécula de anticuerpo primario, la inmunofluorescencia indirecta amplifica de manera efectiva la señal fluorescente, haciendo que sea más sensible que la inmunofluorescencia directa.

resultado, la inmunofluorescencia indirecta produce una amplificación de la señal y es mucho más sensible que la utilización de un único anticuerpo primario. El método es «indirecto» ya que no detecta directamente dónde se unen los anticuerpos a los antígenos; técnicamente, la fluorescencia refleja el sitio al que se ha unido el anticuerpo secundario. Por supuesto, esto refleja el lugar donde se localiza la molécula originaria de interés.

Otras sondas fluorescentes. En microscopía de fluorescencia se emplean también proteínas naturales que son unidas selectivamente a componentes celulares específicos. Por ejemplo, la Figura A.13 muestra una imagen de fluorescencia de células epiteliales teñidas con *faloidina*, una toxina procedente de una seta, marcada con fluoresceína, que se une específicamente a los microfilamentos de actina. Otra técnica potente de fluorescencia utiliza la proteína verde fluorescente (GFP), una proteína fluorescente de origen natural producida por la medusa *Aequoria victoria*. Usando técnicas de DNA recombinante, los científicos pueden unir el DNA que codifica para GFP a un gen que codifica una proteína celular en particular. El DNA recombinante resultante se puede introducir dentro de las células, en las que se expresará para producir una versión fluorescente de la proteína celular normal. En muchos casos, la fusión de GFP al final de una proteína no interfiere con su función, lo que permite el uso de la microscopía de fluorescencia para visualizar proteínas fusionadas a GFP mientras éstas desempeñan sus funciones en una célula viva (Figura A.14). Los biólogos moleculares han producido formas mutantes de GFP que absorben y emiten luz de diversas longitudes de onda. Además, se han identificado otras proteínas de origen natural, la proteína fluorescente roja del coral. Estas herramientas han expandido el repertorio de moléculas fluorescentes que están a disposición de los biólogos celulares.

La microscopía de fluorescencia se puede utilizar para monitorizar la distribución subcelular de varios iones además de para detectar macromoléculas como proteínas. Para conseguirlo, los químicos han sintetizado moléculas cuyas propiedades de fluorescencia son sensibles a las concentraciones de iones como Ca^{2+}, H^+, Na^+, Zn^{2+} y Mg^{2+}, así como a potenciales eléctricos a través de la membrana plasmática. Cuando estas sondas fluorescentes se inyectan en células de forma que se quedan restringidas al citosol o a un componente intracelular específico, producen información importante acerca de las condiciones iónicas dentro de la célula. Por ejemplo, una sonda fluorescente llamada *fura-2* se emplea habitualmente para estudiar las concentraciones de Ca^{2+} dentro de células vivas, ya que fura-2 emite fluorescencia amarilla en presencia de concentraciones bajas de Ca^{2+} y fluorescencia verde o azul en presencia de concentraciones progresivamente más altas de este ion. Por lo tanto, la monitorización del color de la fluorescencia en células vivas teñidas con esta sonda permite a los científicos observar cambios en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} a medida que éstas se producen.

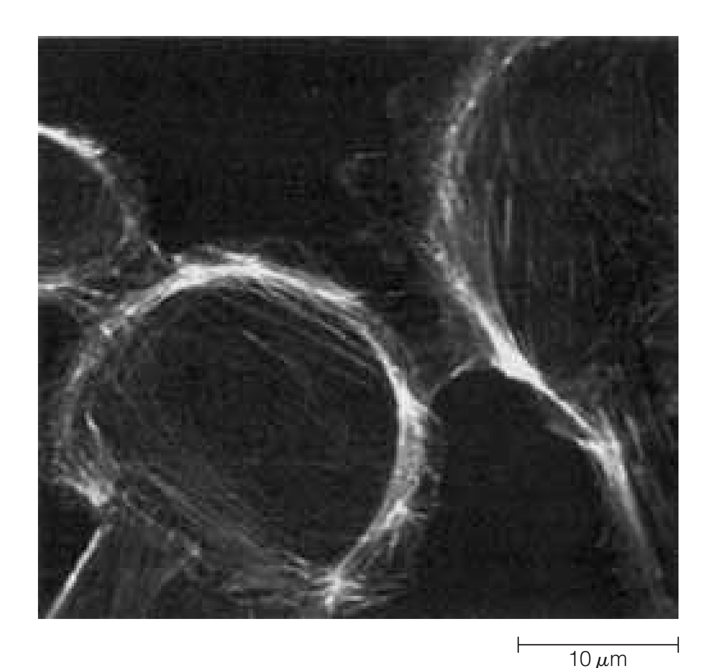


Figura A.13 Microscopía de fluorescencia. Células epiteliales de riñón de perro teñidas con el colorante fluorescente phalloidina, que se une a los microfilamentos de actina.

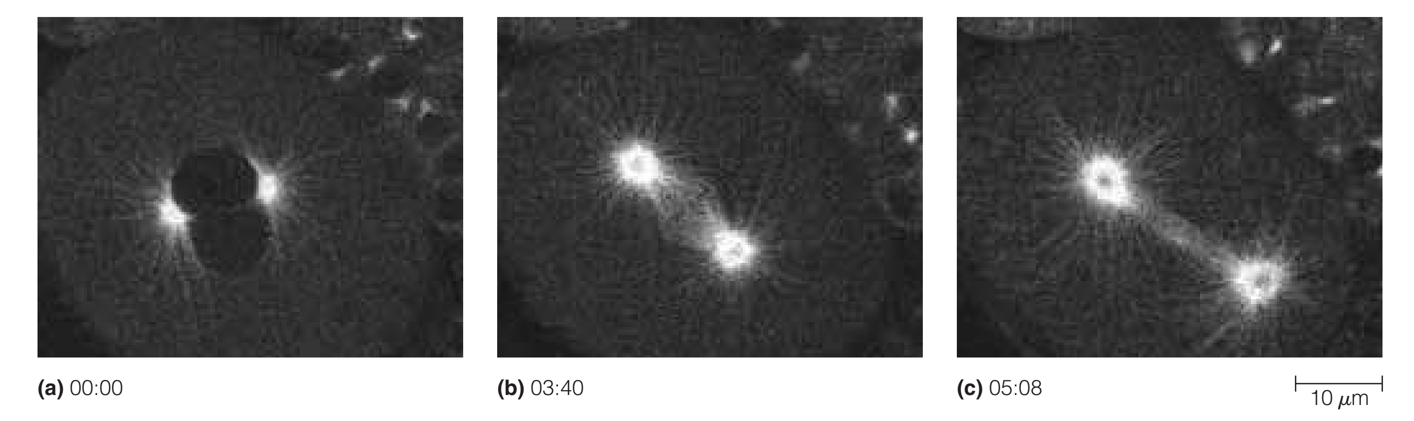


Figura A.14 Utilización de la proteína fluorescente verde para visualizar proteínas. Serie de imágenes de una célula de un embrión de nematodo experimentando mitosis. El embrión expresa β-tubulina que está unida a la proteína fluorescente verde (GFP). El tiempo respecto a la primera se muestra en minutos:segundos.

La microscopía confocal minimiza el aspecto borroso mediante la exclusión de la luz fuera de foco de la imagen

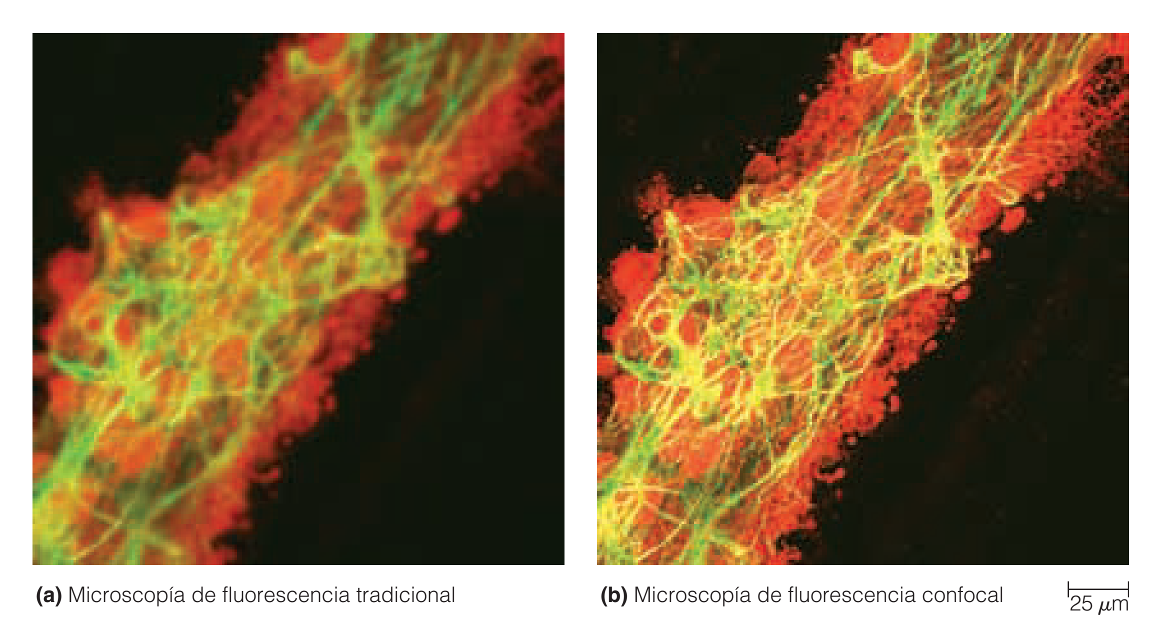
Cuando se visualizan células intactas, la resolución de la microscopía de fluorescencia está limitada por el hecho de que aunque se emite fluorescencia a través de toda la profundidad de la muestra, el observador únicamente puede enfocar el objetivo en un determinado momento a un único plano. Como resultado, la luz emitida desde regiones de la muestra por encima y por debajo del plano focal hace que la imagen sea borrosa (Figura A.15a). Para solucionar este problema, los biólogos celulares a menudo emplean el **microscopio confocal** —un tipo especializado de microscopio óptico que emplea un haz de luz láser para producir una imagen de un único plano de la muestra en un momento determinado (Figura A.15b)—. Esta aproximación mejora la resolución a lo largo del eje óptico del microscopio —así se pueden distinguir las estructuras localizadas en el que centro de la célula de las que están en la superficie o de la parte inferior—. De igual forma, se puede distinguir una célula en el centro de una pieza de tejido de las células que están por encima o por debajo de ella.

Para entender este tipo de microscopía es necesario primero considerar los recorridos de la luz que atraviesa una lente simple. La Figura A.16 ilustra cómo una lente forma una imagen de una fuente puntual de luz. Para entender lo que vería su ojo imagine que coloca un trozo de una película fotográfica en el plano de foco (plano de la imagen). Ahora pregúntese cómo contribuyen a la imagen original las imágenes procedentes de otros puntos de luz localizados más cerca o más lejos de la lente (Figura A.16b). Como se puede deducir, existe una relación precisa entre la distancia entre el objeto y la lente (o), la distancia entre la lente y la imagen enfocada del objeto (i) y la distancia focal de la lente (f). La siguiente ecuación expresa esta relación:

$$\frac{1}{f} = \frac{1}{o} + \frac{1}{i} \qquad \textbf{(A.5)}$$

Como muestra la Figura A.16b, la luz que se origina a partir de los puntos que no están en foco cubre una superficie mayor de la película ya que los rayos convergen o divergen. Así, la imagen en la película está formada por la fuente puntual original, que está en foco, y un halo de luz superpuesto procedente de los objetos fuera de foco.

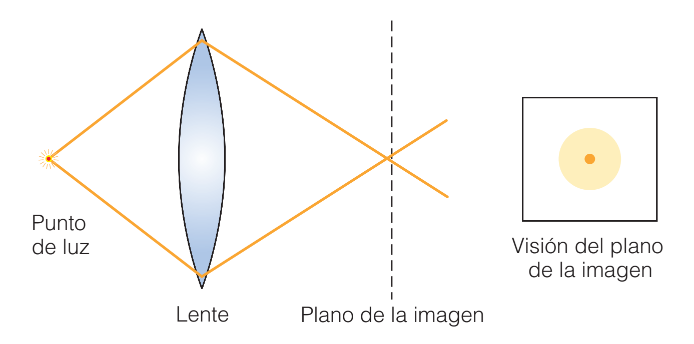
Si únicamente estuviésemos interesados en ver la fuente puntual original, podríamos eliminar la luz ajena a este punto disponiendo una apertura u orificio puntual *(pinhole)*, en el mismo plano de la película. El microscopio confocal emplea este principio para discriminar los rayos fuera de foco. Por supuesto, en una muestra real no tenemos únicamente una fuente puntual de luz extraña a cada lado del objeto que deseamos observar, sino un continuo de puntos. Para entender cómo afecta esto a nuestra imagen, imagine que en lugar de tres puntos de luz nuestra muestra estuviese formada por un tubo de luz fino y largo, como se muestra la Figura A.16c. Considere ahora cómo se ob-



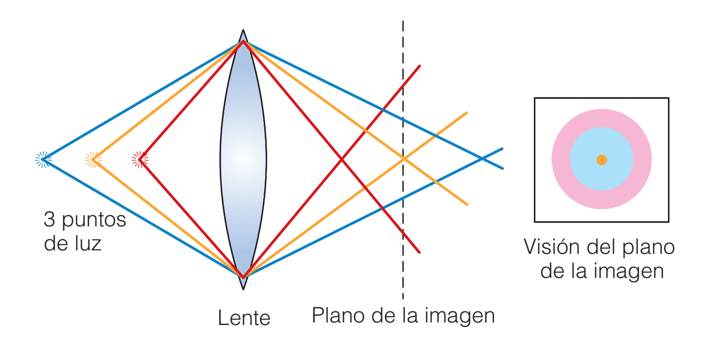
(a) Microscopía de fluorescencia tradicional

(b) Microscopía de fluorescencia confocal

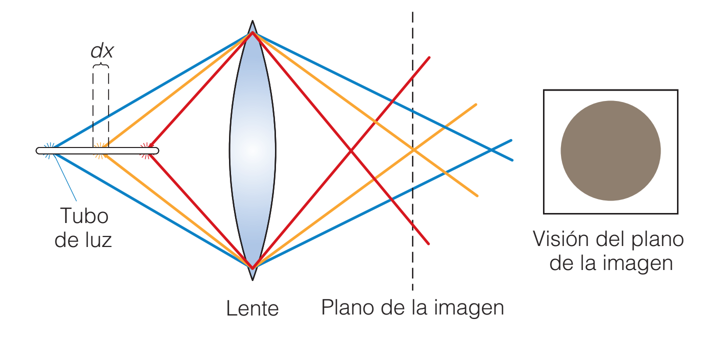
Figura A.15 Comparación de la microscopía de fluorescencia confocal con la microscopía de fluorescencia tradicional. Estas micrografías de fluorescencia muestran células de glía marcadas con fluorescencia (rojo) y células nerviosas (verde) marcadas con dos marcadores fluorescentes diferentes. (**a**) En la microscopía de fluorescencia tradicional se ilumina la muestra completa de forma que el material fluorescente por encima y por debajo del plano de foco tiende a hacer borrosa la imagen. (**b**) En la microscopía confocal de fluorescencia, la luz incidente se enfoca en un único plano, y se excluye la fluorescencia fuera de foco de la muestra. La imagen resultante es por lo tanto mucho más nítida. (Imagen cortesía de Karl Garsha, especialista en microscopía óptica digital, grupo de tecnología de imagen, Instituto Beckman de Ciencia y Tecnología, Universidad de Illinois en Urbana-Champaign, Urbana, IL *www.tig.uiux.edu.*)



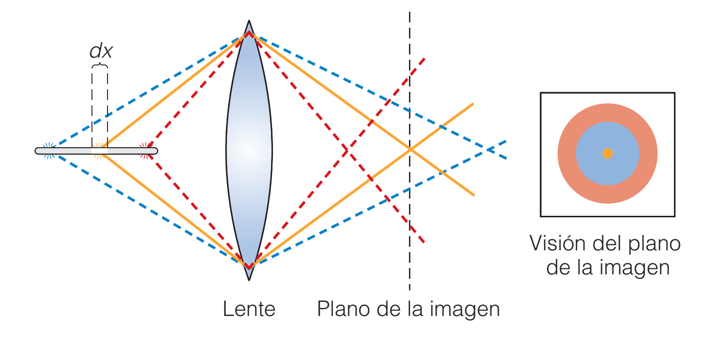
(a) Formación de una imagen por una lente a partir de un único punto de luz



(b) Formación en la imagen de un punto de luz en presencia de otros 2 puntos



(c) Formación de una imagen de una sección de un tubo de luz uniforme



(d) Formación en una imagen de una sección iluminada de un tubo de luz

Figura A.16 Recorridos de la luz a través de una lente. (**a**) Imagen de un punto único de luz formada por una lente. (**b**) Recorridos de la luz a partir de tres puntos de luz situados a diferentes distancias de la lente. En el plano de la imagen, la imagen enfocada del punto central se superpone con los rayos desenfocados procedentes de los otros puntos. Se puede usar una apertura alrededor del punto central para discriminar los rayos desenfocados y maximizar la contribución del punto central. (**c**) Recorridos de la luz originada a partir de un continuo de puntos, representado como un tubo de luz. Esto es semejante a una muestra iluminada uniformemente. En el plano de la imagen, las contribuciones procedentes de una pequeña sección enfocada arbitraria, *dx*, están completamente enmascaradas por los otros rayos fuera de foco; en este caso un pinhole o pequeño orificio no ayuda. (**d**) Mediante la iluminación intensa de una única sección del tubo y la iluminación débil del resto, podemos recuperar la información en el plano de imagen de la sección *dx*. Ahora un orificio localizado alrededor del punto rechaza los rayos fuera de foco. Debido a que los rayos del centro proceden casi todos de *dx*, tenemos una forma de discriminar frente a los puntos más débiles fuera de foco.

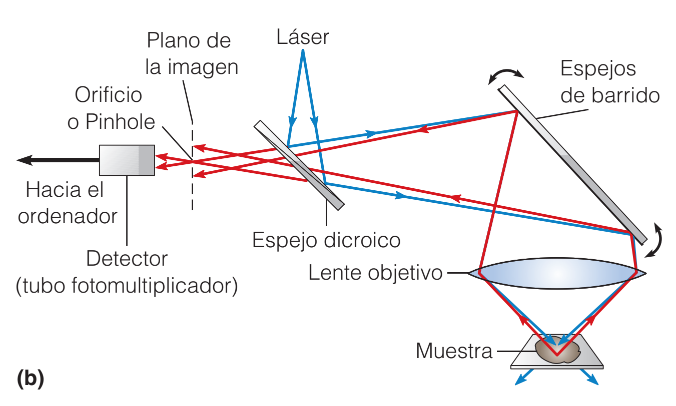
tiene una imagen a partir de una pequeña sección arbitraria, *dx*. Si el tubo envía la misma cantidad de luz por unidad de longitud, entonces incluso con un pinhole, la imagen de interés estará enmascarada por los halos procedentes de otras partes del tubo. Esto sucede porque la pequeña contribución de cada una de las secciones fuera de foco, y todas las pequeñas secciones producen conjuntamente un fondo intenso sobre la sección de interés.

Esta situación es muy semejante a la que encontramos en muestras biológicas reales que se han teñido con una sonda fluorescente. En general, la distribución de la sonda es tridimensional y cuando deseamos mirar en detalle un único objeto (como un microtúbulo) usando microscopia de fluorescencia convencional, la imagen está a menudo estropeada por el halo de luz de fondo que se origina principalmente por los microtúbulos localizados por encima y por debajo del plano de interés. Para evitar esto, podemos iluminar preferentemente el plano de interés desequilibrando así las distintas contribuciones en el plano de la imagen, de forma que procedan principalmente de un único plano (Figura A.16d). Así, la esencia de la microscopia confocal consiste en enfocar en un único plano el haz de iluminación que excita la fluorescencia, y usar un orificio para asegurar que la luz que llega al plano de la imagen se origina principalmente a partir del plano enfocado.

La Figura A.17 ilustra cómo funcionan estos principios en un microscopio láser confocal, que ilumina las muestras empleando un haz de luz láser enfocado a través de una lente objetivo hacia un punto limitado de difracción. La posición del punto se controla mediante espejos de barrido, que permiten que el haz de luz recorra la superficie de la muestra de forma precisa. A medida que el haz hace un barrido sobre la muestra se forma una imagen a partir de la misma de la siguiente forma. En primer lugar, la luz fluorescente emitida por la muestra es captada por la lente objetivo y conducida por el mismo recorrido de la luz inci-



(a)



(b)

Figura A.17 Microscopio de barrido láser confocal. (**a**) Fotografía y (**b**) esquema de un microscopio de barrido láser confocal. Se emplea un láser para iluminar un punto de la muestra en un determinado momento (líneas azules). Los espejos de barrido mueven el punto en un determinado plano de foco siguiendo un patrón preciso. La luz fluorescente emitida por la muestra (líneas rojas) es reflejada por los mismos espejos de barrido y retorna por el mismo recorrido original del haz incidente. La luz emitida no vuelve al láser y, por el contrario, es transmitida a través de un espejo dicróico (que en este ejemplo refleja la luz azul y transmite la luz roja). Un orificio o pinhole en el plano de la imagen bloquea los rayos extraños que están fuera de foco. La luz es detectada por un tubo fotomultiplicador, cuya señal es digitalizada y almacenada en un ordenador.

dente. El recorrido de la luz fluorescente se separa entonces de la luz láser utilizando un espejo dicroico, que refleja luz de un color y transmite la de otro. Debido a que la luz fluorescente tiene una longitud de onda más larga que la luz de excitación, el color de la luz fluorescente es desplazado hacia el rojo. La luz fluorescente atraviesa el orificio localizado en un plano de la imagen, frente a un tubo fotomultiplicador, que actúa como detector. La señal del tubo fotomultiplicador es entonces digitalizada y mostrada en un ordenador. Para ver el incremento de resolución que se obtiene con la microscopía confocal, vuelva a mirar la Figura A.15, que muestra imágenes de la misma célula visualizada mediante microscopía de fluorescencia convencional y mediante microscopía de láser confocal.

Como alternativa a la microscopía láser confocal, el *microscopio confocal de disco giratorio* emplea discos que giran rápidamente y que contiene un conjunto de pequeñas lentes y una serie correspondiente de pinholes. Aunque no puede producir secciones ópticas tan finas como los microscopios láser confocal, puede generar imágenes confocales que se pueden adquirir rápidamente usando cámaras digitales. Esta velocidad es útil para visualizar procesos rápidos que se producen en las células.

En microscopía confocal, se emplea un pinhole para eliminar la luz fuera de foco. El resultado es una imagen nítida, aunque las moléculas por encima y por debajo del plano focal de la lente objetivo están siendo excitadas por la luz incidente. Esto puede producir el blanqueamiento rápido de las moléculas de fluorescencia; en algunos casos, especialmente cuando se observan células vivas que contienen moléculas fluorescentes, este blanqueamiento libera radicales tóxicos que pueden causar la muerte de la célula. Para reducir esta «fototoxicidad» sería deseable que únicamente fuesen excitadas las moléculas fluorescentes muy próximas al plano focal que se está examinando. Esto es posible utilizando la **microscopía de excitación multifotón**. En la microscopía de excitación multifotón, se emplea un láser que emite pulsos de luz de muy alta energía y muy rápidamente para irradiar la muestra. Para que se produzca fluorescencia, la molécula fluorescente debe absorber una rápida sucesión de dos (o en algunos casos tres o más) fotones (Figura A.18). La probabilidad de que esto se produzca es muy baja, excepto cerca del plano focal del objetivo. Como consecuencia, únicamente las moléculas fluorescentes que están enfocadas emiten fluorescencia. El resultado es muy similar en nitidez a la microscopía confocal, pero no es necesario el pinhole ya que no hay que eliminar luz fuera de foco. También se reduce considerablemente la fototoxicidad. Como ejemplo, se empleó microscopía de excitación multifotón para generar la imagen de la Figura A.14 de un embrión vivo.

Se puede emplear una tercera técnica, la **microscopía digital de deconvolución**, para producir imágenes muy nítidas. La deconvolución digital se basa en un principio completamente diferente. En este caso, se emplea microscopía de fluorescencia convencional para adquirir series de imágenes fluorescentes a lo largo del espesor de la muestra. Entonces se emplea un ordenador para procesar digitalmente, *o deconvolucionar*, cada plano focal para eliminar matemáticamente la contribución debida a la luz fuera de foco. En muchos casos, la deconvolución digital puede producir imágenes comparables a las obtenidas mediante mi-

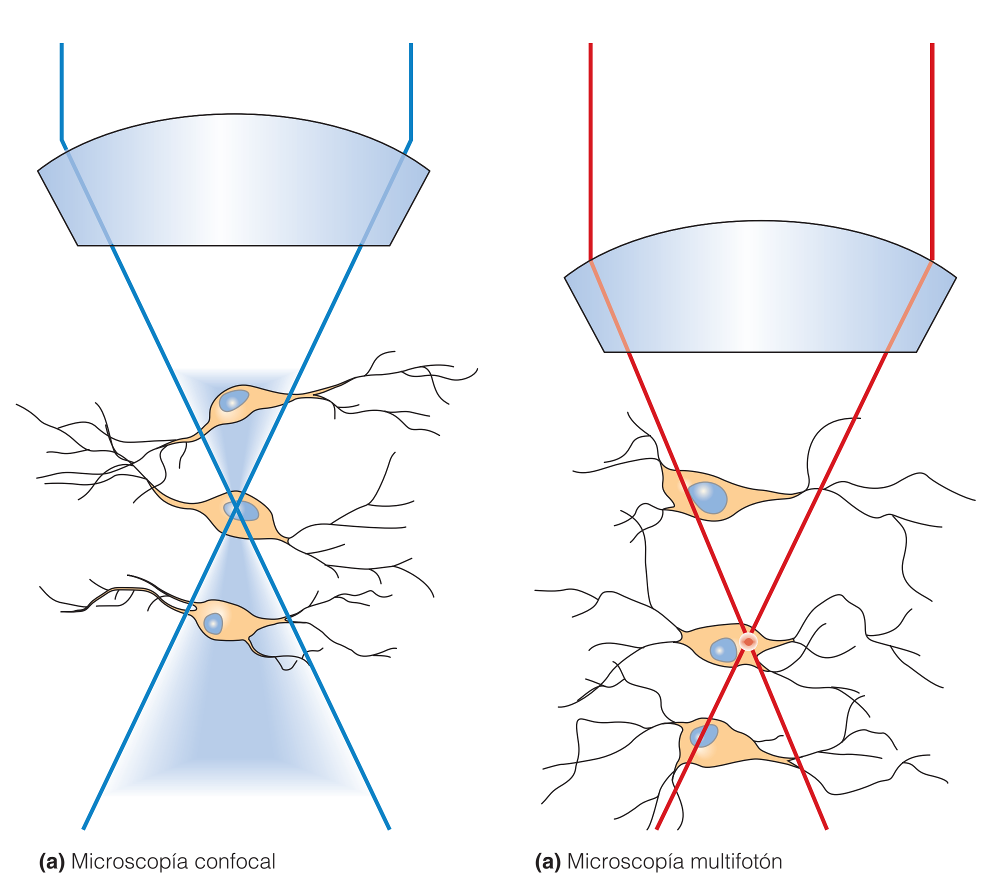


Figura A.18 Microscopía de excitación multifotón. (a) En un microscopio confocal estándar se produce fluorescencia en un recorrido con forma de reloj de arena a través de la muestra. Debido a que una zona amplia emite fluorescencia es mucho más probable que se produzca fototoxicidad que en la microscopía de excitación multifotón. (**b**) En un microscopio de excitación multifotón la fluorescencia está limitada al punto de foco de los pulsos del láser infrarrojo, lo que produce mucho menos daño. La iluminación infrarroja también penetra más profundamente en la muestra que la luz visible.

croscopía confocal (Figura A.19). Una ventaja de la deconvolución es que microscopía no está restringida a las longitudes de onda específicas que se emplean comúnmente en los láseres de los microscopios confocales.

La videomicroscopía digital puede registrar imágenes consecutivas optimizadas

El advenimiento de detectores de luz de estado sólido ha hecho posible en muchos casos reemplazar la película fotográfica con un equivalente electrónico —por ejemplo, con una cámara de vídeo o una cámara de imagen digital—. Estas mejoras han dado lugar a la técnica de **videomicroscopía digital**, en la que se registran y se almacenan electrónicamente imágenes microscópicas poniendo una cámara de vídeo en el plano de la imagen producido por la lente ocular. Esta aproximación se aprovecha del hecho de que las cámaras de vídeo pueden detectar pequeñas diferencias de contraste con mayor sensibilidad que el ojo humano.

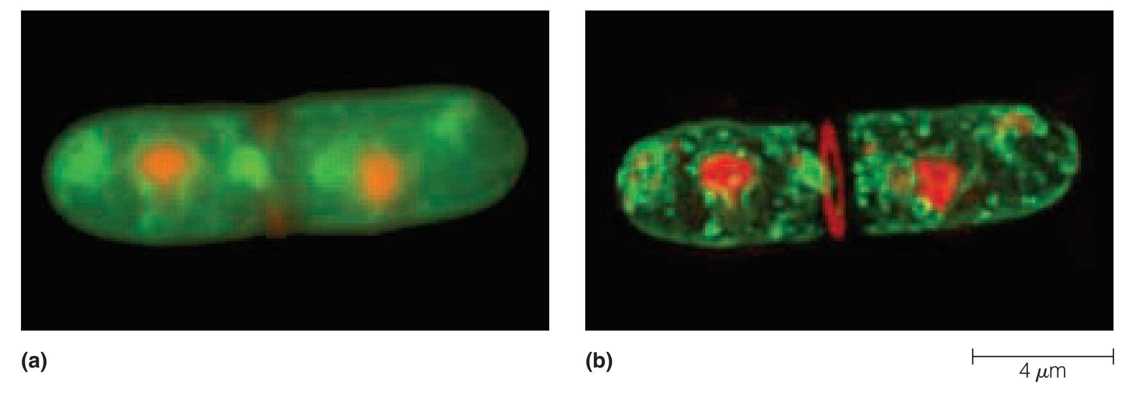


Figura A.19 Microscopía de deconvolución digital. Fisión de una célula de levaduras teñida con un colorante específico para el DNA (rojo) y un colorante específico de membrana (verde). La imagen de la izquierda es una sección óptica sin procesar a través del centro de la célula. La imagen de la derecha es una proyección de todas las secciones después del procesamiento tridimensional de la imagen. El anillo del tabique central en desarrollo (rojo) se está formando entre los dos núcleos (rojo) que surgieron por división nuclear durante la mitosis previa.

Además, las cámaras de vídeo generan imágenes en un formato digital que pueden ser *optimizadas* mediante el procesamiento digital. En el proceso de optimización, primero se almacena la señal de la cámara como un conjunto de números en dos dimensiones cuyos valores corresponden a la claridad u oscuridad de una localización particular en la imagen. Los datos se procesan entonces para incrementar el contraste y para eliminar las características del fondo que enmascaran la imagen de interés (Figura A.20).

Las mejoras producidas permiten la visualización de estructuras que son un orden de magnitud más pequeñas de las que se pueden observar mediante microscopía óptica convencional. Como hemos visto, la microscopía óptica convencional es generalmente incapaz de resolver objetos más pequeños de 200 nm de diámetro. Por el contrario, la videomicroscopía computerizada permite la visualización de microtúbulos individuales que miden únicamente 25 nm de diámetro. Las técnicas digitales de vídeo se pueden aplicar a la microscopía convencional de campo claro, así como a la microscopía DIC y confocal, creando así un conjunto poderoso de aproximaciones para incrementar la eficacia de la microscopía óptica.

Una ventaja adicional de la videomicroscopía digital es el que la muestra no necesita estar fijada, como es el caso en la microscopía electrónica, de forma que se pueden monitorizar procesos dinámicos a medida que éstos se producen. Además, se han desarrollado cámaras de vídeo especialmente sensibles que pueden detectar imágenes extremadamente débiles facilitando así la capacidad de registrar una serie rápida de imágenes consecutivas de los procesos celulares a medidas que éstos se producen. Por ejemplo, utilizando una película fotográfica convencional, podría llevar más de minuto registrar una imagen del marcaje fluorescente, lo que significa que una serie de fotografías consecutivas podría sólo mostrar una foto de una célula por minuto. Sin embargo, si una cámara de vídeo optimizada puede registrar una imagen de la misma célula 30 veces por segundo, esto permite monitorizar cambios rápidos en el aspecto y el comportamiento de componentes subcelulares. Esto ha permitido a los científicos obtener información de los cambios en la concentración y en la distribución subcelular de componentes citosólicos como segundos mensajeros durante la señalización celular, y estudiar el papel de las estructuras de citoesqueleto en los movimientos intracelulares. Así, la videomicroscopía digital ha ampliado enormemente nuestra capacidad para monitorizar procesos al tiempo que se producen en las células vivas.

La microscopía digital no es solamente útil para examinar procesos en un plano focal. En una variante de esta técnica se emplea un ordenador para controlar el foco motorizado de un microscopio. De esta forma, se captan imágenes a lo largo del espesor de la muestra. Cuando estas series de imágenes se captan a intervalos de tiempo específicos, este tipo de microscopía se denomina *microscopía en cuatro dimensiones* (expresión acuñada a partir de la física; las cuatro dimensiones son las tres dimensiones del espacio más la dimensión adicional del tiempo). El análisis de los datos en cuatro dimensiones requiere aplicaciones informáticas especializadas que pueden navegar entre los planos focales a lo largo del tiempo para mostrar imágenes específicas.

Se pueden emplear métodos ópticos para medir los movimientos y las propiedades de las proteínas y otras macromoléculas

La microscopía óptica puede ayudarnos a visualizar dónde se localizan las moléculas dentro de las células y para estudiar la dinámica de los movimientos y las propiedades de las moléculas biológicas. Consideraremos brevemente estas técnicas modernas en esta sección.

Fotoblanqueamiento y fotoactivación. Cuando las moléculas fluorescentes son irradiadas con luz de la longitud de onda

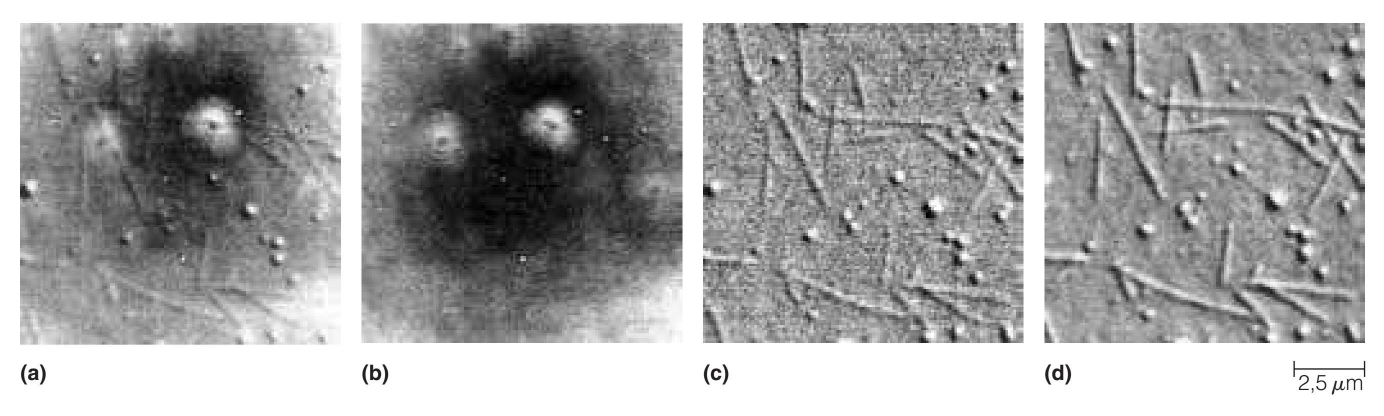


Figura A.20 Videomicroscopía digital computerizada. Esta serie de micrografías muestra cómo se pueden emplear los ordenadores para mejorar las imágenes obtenidas mediante microscopía óptica. En este ejemplo, la imagen de numerosos microtúbulos, que son demasiado pequeños para ser observados mediante microscopía óptica convencional, se procesan para hacerlos visibles en detalle. (**a**) Imagen resultante del incremento electrónico del contraste de la imagen original (que parece estar vacía). (**b**) Fondo de la imagen procesada en (a) que es sustraído (**c**) de la imagen (a) dejando como resultado únicamente los microtúbulos. (**d**) Imagen final detallada que resulta del promedio electrónico de las imágenes individuales procesadas que se muestran en a-c.

de excitación apropiada durante largos periodos de tiempo, sufren un **fotoblanqueamiento** (la irradiación induce que las moléculas dejen de emitir fluorescencia). Si solamente una pequeña región de la célula es expuesta a la luz intensa, el blanqueamiento produce una disminución característica de la fluorescencia en esta zona (Figura A.21a). A medida que las moléculas no blanqueadas se mueven hacia la zona blanqueada, se recobra gradualmente los niveles de fluorescencia. La *recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueamiento (FRAP)* es una medida útil de la velocidad a la que las moléculas difunden o son transportadas directamente (*véase* la Figura 7.11 para un ejemplo clásico de la utilización de FRAP).

En otros casos, las moléculas fluorescentes son modificadas químicamente para no emitir fluorescencia hasta que son irradiadas con luz de una longitud de onda específica, normalmente luz ultravioleta. La luz ultravioleta induce la liberación del modificador químico, permitiendo que la molécula de interés emita fluorescencia. Se han producido tanto colorantes modificados químicamente como formas de GFP que se comportan de esta forma. Estos compuestos se denominan con frecuencia *compuestos enjaulados*, ya que son únicamente «liberados» por la escisión inducida por la luz. La liberación, o **fotoactivación**, produce la situación contraria al fotoblanqueamiento: la liberación local de una molécula fluorescente produce un punto luminoso de fluorescencia que se puede seguir a medida que las moléculas siguen su camino a lo largo de la célula (Figura A.21b). La liberación por fotoactivación se puede emplear también para transformar otro tipo de moléculas inertes a su estado activo. Por ejemplo, el «calcio enjaulado» consiste en un quelante de calcio que está unido a los iones calcio. Cuando el compuesto enjaulado es irradiado, libera el calcio que lleva unido, produciendo una elevación local de calcio dentro de la célula.

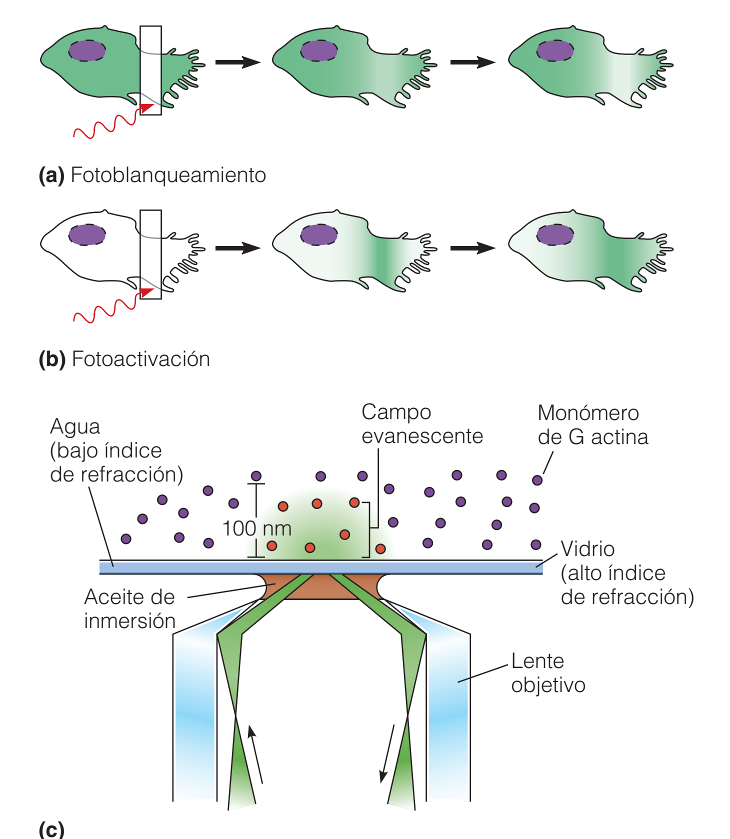


Figura A.21 Técnicas de estudio de los movimientos dinámicos de las moléculas dentro de las células. (**a**) Fotoblanqueamiento de moléculas fluorescentes. Un área bien definida de una célula es irradiada, lo que produce el blanqueamiento de las moléculas fluorescentes. Gradualmente, nuevas moléculas sin blanquear invaden la zona blanqueada. (**b**) Fotoactivación de proteínas fluorescentes. La fotoactivación de una región seleccionada, como el núcleo (indicado en rojo), produce un incremento de la fluorescencia. El movimiento posterior de moléculas fluorescentes se puede monitorizar. (**c**) Microscopía de fluorescencia de reflexión total interna (TIRF). El ejemplo mostrado implica monómeros fluorescentes de G actina (*véase* Capítulo 15). Cuando un haz paralelo de luz en un medio con un alto índice de refracción (como el vidrio) incide sobre su interfase con un medio de menor índice de refracción (como una célula o el agua) con un ángulo que supera el ángulo crítico, sufre una reflexión total interna. La reflexión total interna produce un «campo evanescente» en el medio de menor índice de refracción, que decae rápidamente con la distancia. Esto permite la observación únicamente de un número pequeño de moléculas fluorescentes.

Microscopía de fluorescencia de reflexión total interna. La microscopía de florescencia de reflexión total interna (TRIF) supone un método incluso más preciso para observar las moléculas fluorescentes. TRIF se basa en una propiedad útil de la luz: cuando la luz se mueve desde un medio con un alto índice de refracción (como el vidrio) a un medio con un índice de refracción menor (como el agua o una célula), si el ángulo de incidencia de la luz supera un cierto valor (denominado *ángulo crítico*), la luz es reflejada. Usted puede estar familiarizado con los cables de fibra óptica, que se basan en el mismo principio físico. La curvatura de la fibra produce que casi toda la luz que entra en el cable sea reflejada internamente, permitiendo a estas fibras servir como «tuberías de luz». Los microscopistas pueden también usar lentes especiales para hacer uso de la reflexión total interna. Cuando una célula emite luz brillante fluorescente de forma que toda la luz supera el ángulo crítico, se producirá la reflexión total interna. ¿Por qué es útil la TRIF si se refleja toda la luz? Una capa de luz muy pequeña, llamada el «campo evanescente» se extiende hacia el agua o la célula (Figura A.21c). Esta capa es muy fina, de alrededor de 100 nm, haciendo que TRIF sea 10 veces mejor que un microscopio confocal para resolver objetos pequeños muy próximos a la superficie del cubreobjetos. Esto hace que TRIF sea especialmente útil para estudiar la liberación de vesículas de secreción o para la observación de la polimerización de actina.

Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia. La microscopía de fluorescencia es útil no solamente para la observación de movimiento de las proteínas, sino tam-

bién para medir las interacciones físicas entre ellas. Cuando dos moléculas fluorescentes cuyas propiedades de fluorescencia están emparejadas y muy próximas entre sí, es posible que sufran **transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET).** En FRET la iluminación de una célula a la longitud de onda de excitación del primer fluoróforo (*donante*) produce la transferencia energía al segundo fluoróforo (*aceptor*). Esa transferencia energía no implica un fotón de luz, pero una vez que ocurre, induce la emisión de luz por el aceptor en su longitud de onda característica. Frecuentemente en FRET se emplea un par de moléculas fluorescentes derivadas de GFP: una brilla con fluorescencia azul (cian) (se denomina frecuentemente *proteína fluorescente cian o CFP*); la otra se excita con luz azul y brilla con un color amarillento (y se denomina *proteína fluorescente amarilla o YFP*). Se puede medir FRET entre dos proteínas separadas (FRET intermolecular; Figura A.22b). La FRET sólo actúa en un rango muy pequeño y como consecuencia, la FRET intermolecular proporciona una lectura del lugar dentro de la célula en el que dos proteínas fluorescentes esencialmente se están tocando.

FRET intramolecular se emplea en diversos tipos de «biosensores moleculares». Vimos un ejemplo de un biosensor en el Capítulo 14, cuando consideramos los «camaleones». Estas proteínas cambian de forma para poner en contacto proteínas fluorescentes azules y amarillas únicamente cuando se elevan los niveles de calcio. La FRET resultante se puede usar como una medida de los niveles locales de calcio. Se están empleando biosensores similares para medir la activación local de pequeñas proteínas G, como Ras, un regulador clave en la señalización del receptor tirosina quinasa (*véase* Capítulo 14). Estos sensores sufren un cambio de forma que permite la FRET únicamente en regiones de la célula en las que se activa Ras (Figura A.22c).

«Pinzas ópticas». La última aplicación de la microscopía óptica que discutiremos puede ser considerada como propia de ciencia ficción, pero se basa en formas bien establecidas de interacción de la luz con los objetos pequeños. Cuando los fotones impactan con objetos pequeños, producen «presión lumínica» sobre ellos. Cuando un objeto pequeño tiene una gran curvatura como es el caso en una pequeña esfera de plástico, las fuerzas diferenciales producidas por un haz de luz láser compacto y canalizado a través del microscopio, tienden a mantener la gota en el centro del haz, atrapándola mediante presión lumínica. Estas **«pinzas ópticas»** se pueden usar para mover objetos, o se pueden usar para producir fuerzas sumamente pequeñas sobre esferas que están unidas a proteínas o a otras moléculas. Por ejemplo, midiendo las fuerzas ejercidas sobre esferas acopladas a la miosina los científicos han sido capaces de medir las fuerzas producidas por el golpe de fuerza de una única molécula de miosina (Figura A.23)

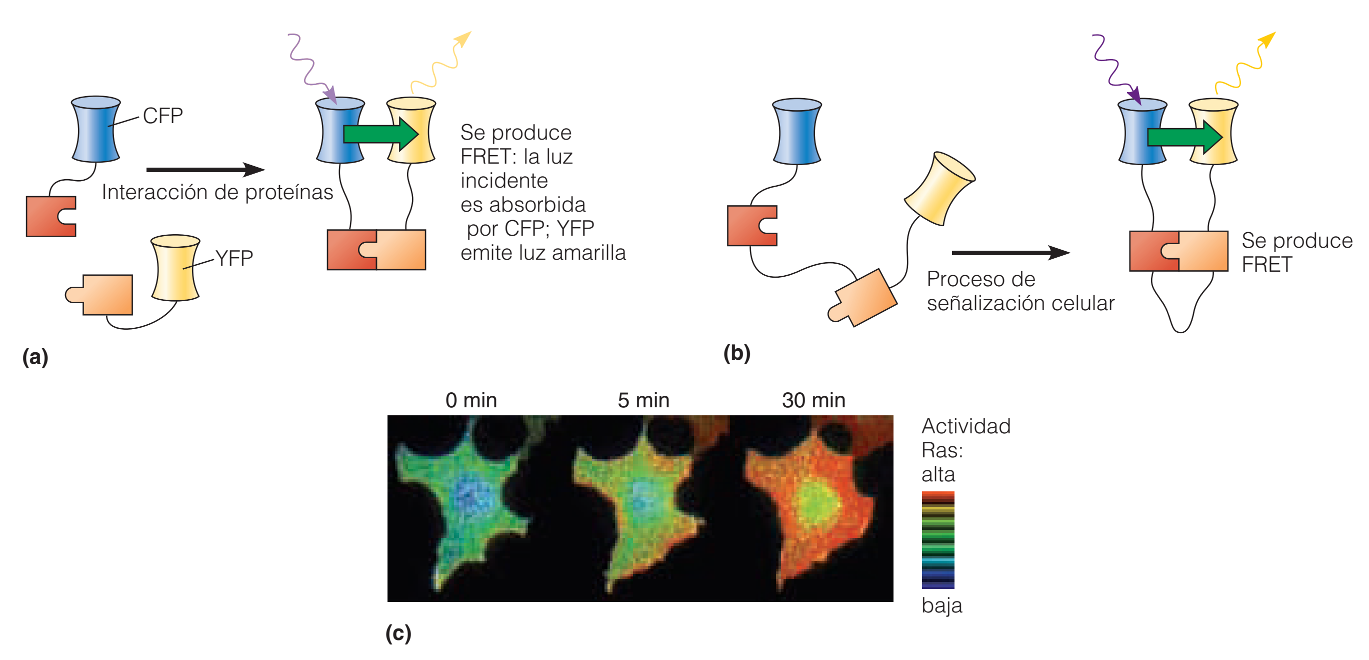


Figura A.22 Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). (**a**) FRET intermolecular. Cuando dos proteínas unidas a dos cadenas laterales fluorescentes (como la proteína fluorescente cian, o CFP, y la proteína fluorescente amarilla o YFP), están muy próximas, al excitar CFP, ésta puede transferir energía directamente a YFP. Entonces YFP emite fluorescencia, y ésta se puede medir. (**b**) FRET intramolecular. En este caso, CFP y YFP están unidas a la misma molécula, pero únicamente pueden interaccionar cuando la proteína sufre un cambio conformacional. Estas proteínas se pueden usar como «biosensores» celulares. (**c**) Detección de la activación de Ras en una célula viva. Una célula COS-1 que expresa una proteína que sufre una FRET intramolecular en las regiones en las que Ras es activa, muestra un incremento de FRET después de exponer la célula al factor de crecimiento epidérmico (EGF), el cual activa a Ras. (Reproducido con permiso de *Nature Publishing Group.*)

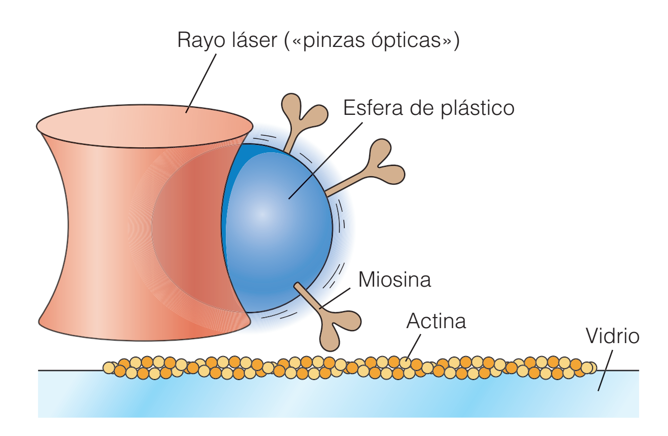


Figura A.23 **«Pinzas ópticas.»** Una pequeña esfera de plástico se puede mantener en un determinado lugar por un haz de luz láser enfocado a través de la lente objetivo de un microscopio. Cuando la esfera está unida a una molécula como la miosina, la fuerza producida cuando la miosina tira de un filamento de actina unido a un portaobjetos de un microscopio se puede medir con precisión.

Técnicas de preparación de muestras para microscopía óptica

Una de las características más atractivas de la microscopía óptica es la facilidad con la que se pueden preparar la mayoría de las muestras para su examen. En algunos casos, la preparación de las muestras no implica más que el montar una pequeña pieza de un espécimen en un líquido adecuado sobre un portaobjetos de vidrio y cubrirla con un cubreobjetos de vidrio. La preparación se coloca entonces en la platina del microscopio y se examina a través del ocular o con una cámara.

Sin embargo, para aprovechar al máximo el poder de resolución de la microscopía óptica, las muestras se preparan habitualmente de una forma que incrementa el *contraste,* es decir, diferencias en la opacidad o en el color de las estructuras que se examinan. Una forma habitual para incrementar el contraste es la aplicación de colorantes específicos que dan color o que alterar las propiedades de transmisión de la luz de los constituyentes celulares. La preparación de células para su tinción generalmente implica los procedimientos especiales que describiremos a continuación.

La preparación de las muestras frecuentemente implica su fijación, seccionamiento y tinción

En los preparativos para la tinción de células, los tejidos deben ser tratados previamente con **fijadores** que matan las células, al tiempo que preservan su apariencia estructural. Los fijadores más ampliamente empleados son los ácidos y aldehídos como el ácido acético, el ácido pícrico, el formaldehído y el glutaraldehído. Una forma de fijación de los tejidos es sencillamente sumergirlos en la solución fijadora. Una aproximación alternativa para tejidos animales consiste en la inyección del fijador en el torrente circulatorio del animal antes de extraer los órganos. Esta técnica, llamada *perfusión*, puede ayudar a reducir los *artefactos*, que son representaciones falsas o inexactas de la muestra, que se producen por el tratamiento químico o por la manipulación de las células y los tejidos.

En la mayoría de los casos, el paso siguiente consiste en cortar la muestra en secciones que sean lo suficientemente finas para transmitir la luz. De otra forma, la muestra sería opaca bajo el microscopio y no serían visibles las estructuras discernibles. Para preparar estas *secciones finas,* la muestra se incluye en un medio (como plástico o parafina) que puede mantener su posición mientras se obtienen las secciones. Debido a que la parafina es insoluble en agua, cualquier resto de agua se debe extraer previamente de la muestra (habitualmente mediante deshidratación en alcoholes) y debe ser reemplazado por un solvente orgánico, como el xileno, en el que es soluble la parafina. El tejido procesado se coloca entonces en un medio caliente de parafina líquida que posteriormente se deja endurecer. La deshidratación es menos crítica si la muestra se incluye en un medio soluble en agua en lugar de en parafina. Las muestras se pueden incluir también en resinas plásticas epoxi o el tejido se puede simplemente congelar de manera rápida como medio alternativo de soporte.

Después de la inclusión o la congelación rápida, la muestra se corta en secciones finas de pocos micrómetros de grosor empleando un **microtomo**, un instrumento que funciona de forma parecida a un seccionador de embutidos (Figura A.24). La muestra se monta simplemente en el brazo de un micrótomo, que la hace avanzar en incrementos pequeños hacia una cuchilla metálica o de vidrio que corta el tejido en secciones finas. A medida que se cortan secciones sucesivas, habitualmente se pegan unas a otras formando una tira de secciones finas. Las secciones se montan entonces en un portaobjetos y se procede a su **tinción** con cualquiera de los colorantes que se han adaptado para este propósito. Algunas veces el tejido se trata con un único colorante, pero más frecuentemente se emplean series de colorantes cada uno de los cuales tiene afinidad por un componente celular diferente. Una vez teñida, la muestra se cubre con un cubreobjetos de vidrio para su protección.

La *autorradiografía microscópica* es una aproximación con importancia histórica para la localización de componentes específicos dentro de las células; es una técnica que emplea una emulsión fotográfica para determinar en qué lugar se localiza un compuesto radioactivo específico dentro de la célula en el momento en el que ésta se fija y se corta para microscopía. En ese procedimiento, los compuestos reactivos se incuban con secciones de tejidos o se administran a las células o a organismos intactos. Después de que haya pasado un periodo de tiempo suficiente para que el compuesto radiactivo sea incorporado en las moléculas y estructuras intracelulares de nueva formación, se lava la radiactividad restante no incorporada, se secciona la muestra de manera convencional y se monta en una preparación microscópica.

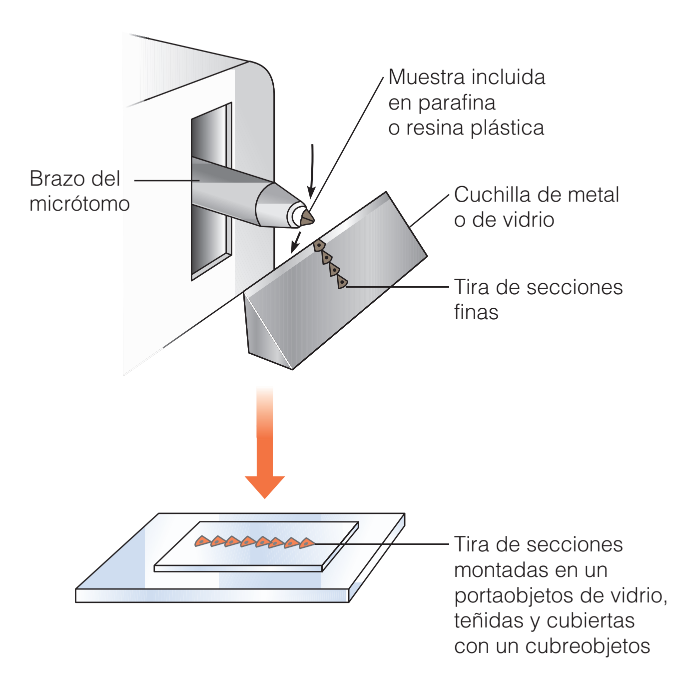


Figura A.24 Obtención de secciones con un micrótomo. La muestra fijada se incluye en parafina o resina plástica y se monta en el brazo de un micrótomo. A medida que el brazo se mueve hacia arriba y hacia abajo siguiendo un arco circular, la cuchilla corta secciones sucesivas. Las secciones se adhieren entre ellas, formando una tira de secciones finas que se puede montar en un portaobjetos de vidrio, teñir y protegerse con un cubreobjetos.

La preparación se cubre entonces con una capa delgada de emulsión fotográfica y se coloca en una caja sellada durante el periodo de tiempo deseado, que frecuentemente es de varios días o incluso semanas. Cuando la emulsión se revela posteriormente y la muestra se examina con un microscopio aparecen *granos de plata* directamente sobre la muestra, en los puntos en los que la radiación ha estimulado la emulsión. La localización de estos granos de plata, que son visibles tanto con el microscopio óptico como electrónico, puede servirnos para apuntar la región de la célula que contiene la radiactividad.

El microscopio electrónico

El impacto de la microscopía electrónica en nuestro conocimiento de las células se puede describir únicamente como revolucionario. Aun así, igual que la microscopía óptica, la microscopía electrónica tiene tanto ventajas como debilidades. En microscopía electrónica la resolución es mucho mejor, pero la preparación de la muestra y el manejo del instrumento son a menudo más difíciles. Los microscopios electrónicos tienen dos diseños básicos: el *microscopio electrónico de transmisión* y el *microscopio electrónico de barrido*. Ambos son similares, ya que cada uno utiliza un haz de electrones para producir la imagen. Sin embargo, los dos instrumentos emplean mecanismos diferentes para formar la imagen final como veremos a continuación.

La microscopía electrónica de transmisión forma la imagen a partir de los electrones que atraviesan la muestra

El tipo de microscopio electrónico que se emplea más comúnmente se llama **microscopio electrónico de transmisión (TEM)** ya que forma una imagen a partir de los electrones que se *transmiten* a través de la muestra que está siendo examinada. Como se muestra en la Figura A.25, la mayoría de los componentes del TEM tienen nombres y funciones semejantes a sus equivalentes en el microscopio óptico, aunque su orientación física está invertida. Examinaremos brevemente cada una de las características principales.

Sistema de vacío y cañón de electrones. Debido a que los electrones no pueden viajar muy lejos a través del aire, se debe mantener un intenso vacío a lo largo de todo el recorrido del haz de electrones. Para crear este vacío dos tipos de bombas de vacío funcionan de manera conjunta. En algunos TEMs se incorpora un dispositivo llamado *trampa de vacío* como parte del sistema de vacío para ayudar a establecer un nivel de vacío elevado. La trampa fría es un metal introducido en la columna del microscopio que se enfría con nitrógeno líquido. La trampa de frío atrapa gases y moléculas contaminantes que se solidifican en la superficie del metal frío.

Los electrones en un TEM son generados por un **cañón de electrones**, un conjunto compuesto por diversos componentes. El *cátodo*, un filamento de tungsteno semejante al filamento de una bombilla, libera electrones de su superficie cuando es calentado. La punta del cátodo está cerca de una apertura circular en un cilindro de metal. Un voltaje negativo en este cilindro ayuda a controlar la emisión de electrones y a dar forma al haz. En el otro extremo del cilindro se encuentra el *ánodo*. El ánodo se mantiene a 0 V mientras que el cátodo se mantiene a 50-100 kV. Esta diferencia de voltaje hace que los electrones se aceleren al pasar a través del cilindro y por lo tanto se denomina **potencial de aceleración**.

Lentes electromagnéticas y formación de la imagen. La formación de una imagen en un microscopio electrónico depende tanto de la longitud de onda como de las propiedades particuladas de los electrones. Debido a que los electrones son partículas cargadas negativamente, su movimiento puede ser alterado por fuerzas magnéticas. Esto significa que la trayectoria de un haz de electrones se puede controlar usando electroimanes, de la misma forma que las lentes de vidrio pueden desviar los rayos de luz que pasan a través de ellas.

Al tiempo que él haz abandona el cañón de electrones, entra en una serie de lentes electromagnéticas (Figura A.25b). Cada lente es simplemente un espacio bajo la influencia de un campo electromagnético. La distancia focal de cada lente se puede incrementar o disminuir variando la

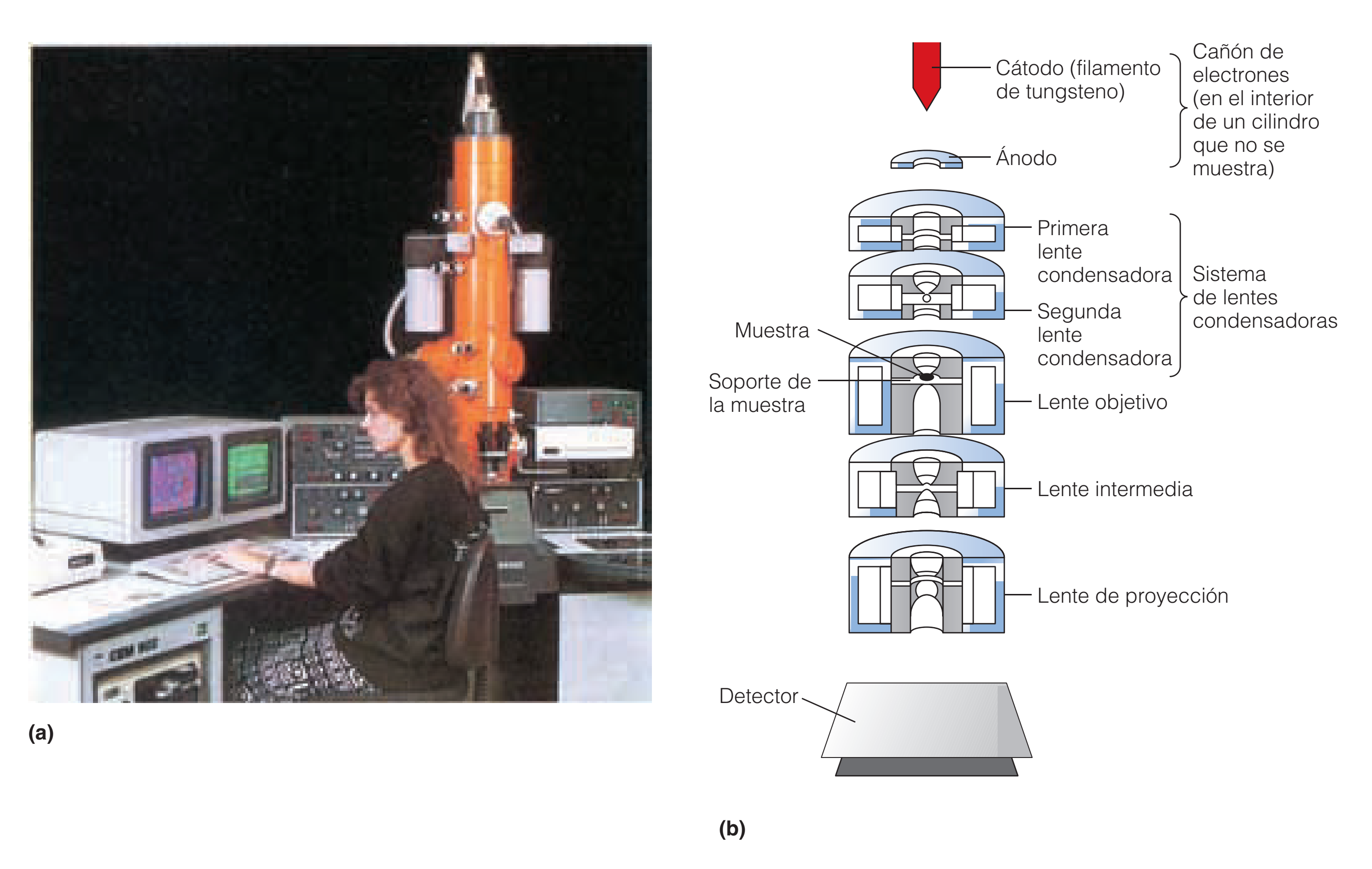


Figura A.25 **Microscopio electrónico de transmisión.** (**a**) Fotografía y (**b**) diagrama esquemático de un TEM.

cantidad de corriente eléctrica aplicada a la espiral. Así, cuando se disponen varias ventas juntas, éstas pueden controlar la iluminación, el foco y los aumentos.

La **lente condensadora** es la primera en afectar al haz de electrones. Funciona de la misma forma que su equivalente en el microscopio óptico para enfocar el haz sobre la muestra. La mayoría de microscopios electrónicos usan un sistema de lentes condensadoras con dos lentes para enfocar mejor el haz de electrones. El siguiente componente, la lente objetivo, es la parte más importante del sistema de lentes del microscopio electrónico. La **lente objetivo**, junto con la **lente intermedia**, y la **lente de proyección**, producen una imagen final en una *pantalla* que emite fluorescencia cuando recibe impactos de los electrones o en un detector que genera directamente la imagen.

¿Cómo se forma la imagen a partir de la acción de estas lentes electromagnéticas sobre un haz de electrones? Recuerde que el haz de electrones generado por el cátodo pasa a través de un sistema de lentes condensadoras y afecta a la muestra. Cuando impactan sobre la muestra, algunos electrones son dispersados por la muestra, mientras que otros continúan su recorrido relativamente sin desviación. Esta desviación de electrones es el resultado de las propiedades creadas en la muestra mediante los protocolos de preparación que describiremos a continuación. La preparación de la muestra, en otras palabras, confiere a la muestra *densidad selectiva a los electrones;* es decir, algunas zonas se hacen más opacas a los electrones que otras. Las zonas electrodensas de la muestra aparecerán oscuras, ya que son atravesadas por pocos electrones, mientras que otras áreas aparecerán más claras, ya que permiten el paso de una mayor cantidad de electrones.

El contraste entre las zonas claras, oscuras e intermedias de la muestra forman la imagen final. El hecho de que la imagen está formada por diferentes grados de transmisión de electrones a través de la muestra queda reflejado en el hombre de *microscopio electrónico de transmisión.*

Sistema de captura de imagen. Debido a que los electrones no son visibles para el ojo humano, la imagen final es detectada en el microscopio electrónico de transmisión al permitir a los electrones transmitidos impactar sobre una pantalla fluorescente o una película fotográfica. La utilización de película permite crear impresiones fotográficas que se denominan **micrografías electrónicas**, y que se transforman en un registro fotográfico permanente de la muestra (Figura A.26a). En muchos microscopios modernos una cámara digital registra la pantalla o un detector digital detecta directamente los electrones incidentes.

Voltaje. El haz de electrones es demasiado débil para penetrar en las muestras biológicas, de forma que las mues-





Figura A.26 Comparación de micrografías electrónicas de transmisión y de barrido. (**a**) La micrografía electrónica de transmisión muestra las membranas del retículo endoplásmico rugoso en el citoplasma de una célula pancreática de rata. La apariencia «rugosa» de las membranas de esta muestra está causada por la presencia de numerosos ribosomas unidos a la membrana. (**b**) Una muestra similar visualizada con un microscopio electrónico de barrido revela la apariencia tridimensional del retículo endoplásmico rugoso, aunque no se pueden distinguir los ribosomas individuales.

tras que se examinan mediante microscopía electrónica de transmisión convencional deben ser extremadamente finas (normalmente no más de 100 nm de grosor). De lo contrario, los electrones no serían capaces de atravesar la muestra y la imagen sería completamente opaca. La observación de secciones más gruesas requiere un **microscopio electrónico especial de alto voltaje (HVEM)**, que es similar a un microscopio electrónico de transmisión pero utiliza un voltaje de aceleración mucho más alto —alrededor de 200-1.000 kV en comparación con los 50-100 kV de un TEM—. Debido a que el poder de penetración del haz de electrones resultante es aproximadamente 10 veces mayor que el de los microscopios electrónicos convencionales, se pueden examinar secciones relativamente gruesas con una buena resolución. Como resultado, la estructura celular se puede estudiar en secciones de hasta 1 μm de grosor, lo que supone 10 veces el grosor posible con un TEM ordinario.

La microscopía electrónica de barrido revela la arquitectura de la superficie de células y orgánulos

La microscopía electrónica de barrido es un tipo fundamentalmente diferente de microscopía electrónica que produce imágenes a partir de los electrones reflejados por la superficie externa de la muestra (en lugar de los electrones transmitidos a través de la misma). Es una técnica especialmente espectacular debido a la sensación de profundidad que confiere a las estructuras biológicas, permitiendo por lo tanto estudiar la topografía de superficie (Figura A.26b). Como su nombre implica, un **microscopio electrónico de barrido (SEM)** genera una imagen mediante el barrido de la superficie de la muestra con un haz de electrones.

En la Figura A.27 se muestra un SEM y su sistema óptico. El sistema de vacío y la fuente de electrones son similares a los del TEM, aunque el voltaje de aceleración es más bajo (alrededor de 5-30 kV). La principal diferencia entre los dos tipos de instrumentos consiste en la forma en la que se genera la imagen. En un SEM el sistema de lentes electromagnéticas enfoca intensamente el haz de electrones en un punto que se mueve sobre la superficie de la muestra mediante placas cargadas denominadas *deflectores del haz*, localizados entre la lente condensadora y la muestra. Los deflectores atraen o repelen el haz de acuerdo con las señales enviadas desde un circuito deflector (Figura A.27b).

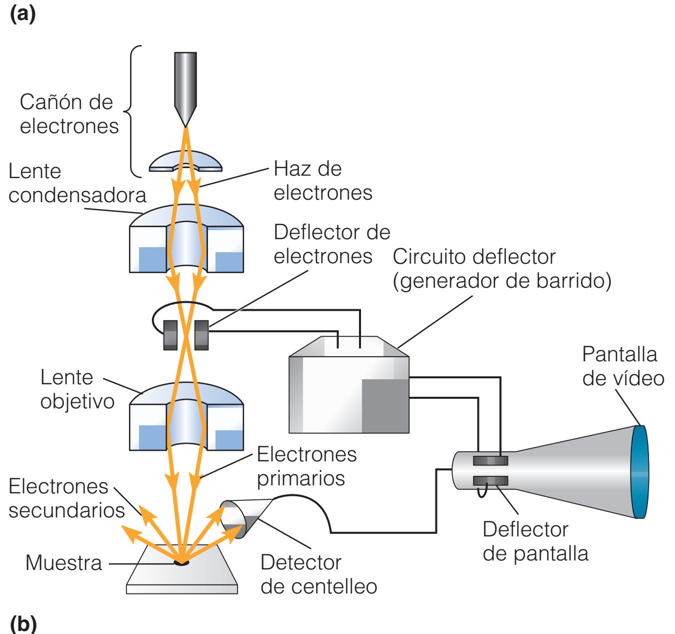
Mientras el haz de electrones barre rápidamente la muestra, las moléculas de la muestra se excitan a niveles altos de energía y emiten *electrones secundarios*. Estos electrones emitidos son captados por un detector localizado inmediatamente por encima y en un lado de la muestra, generando una imagen de su superficie. El componente esencial del detector es un *detector de centelleo*, que emite fotones de luz cuando es excitado por electrones que inciden sobre él. Los fotones se emplean para generar una señal electrónica sobre una pantalla de vídeo. La imagen se genera entonces punto por punto, línea por línea en la pantalla al tiempo que el haz primario de electrones va barriendo la muestra.

Técnicas de preparación de muestras para microscopía electrónica

Las muestras para ser examinadas mediante microscopía electrónica se pueden preparar de diversas formas dependiendo del tipo de microscopio y del tipo de información que pretenda obtener el microscopista. En cada caso, sin



(a)



(b)

Figura A.27 Microscopio electrónico de barrido. (**a**) Fotografía y (**b**) diagrama esquemático de un SEM. La imagen es generada por los electrones secundarios (líneas naranjas cortas) emitidos por la muestra al enfocar y desplazar rápidamente el haz de electrones primarios (líneas naranjas largas) sobre ella. La señal hacia la pantalla de vídeo está sincronizada con el movimiento del haz de electrones primarios sobre la muestra por el circuito deflector del generador de barrido.

embargo, el método es complicado, requiere mucho tiempo y es más costoso en comparación con los métodos que se emplean en microscopía óptica. Además, no se pueden examinar células vivas debido al vacío al que hay que someter a las muestras en el microscopio electrónico.

La obtención de secciones ultrafinas y la tinción son técnicas preparativas comunes en microscopía electrónica de transmisión

La forma más común de preparar muestras para microscopía electrónica de transmisión implica el seccionamiento de tejidos y células en secciones ultrafinas, de no más de 50-100 nm de grosor (menos de la décima parte del grosor de las secciones que se emplean normalmente en microscopía óptica). Las muestras deben ser previamente fijadas químicamente y estabilizadas. El proceso de fijación mata a las células pero mantiene los componentes celulares en gran medida tal y como eran en las células vivas. Los fijadores que se emplean son habitualmente soluciones de aldehídos y muy comúnmente glutaraldehído. Después de la fijación, la muestra se tiñe habitualmente con una solución al 1-2% de tetraóxido de osmio tamponado (OsO_4), que se une a varios componentes de las células, haciéndolos más densos a los electrones.

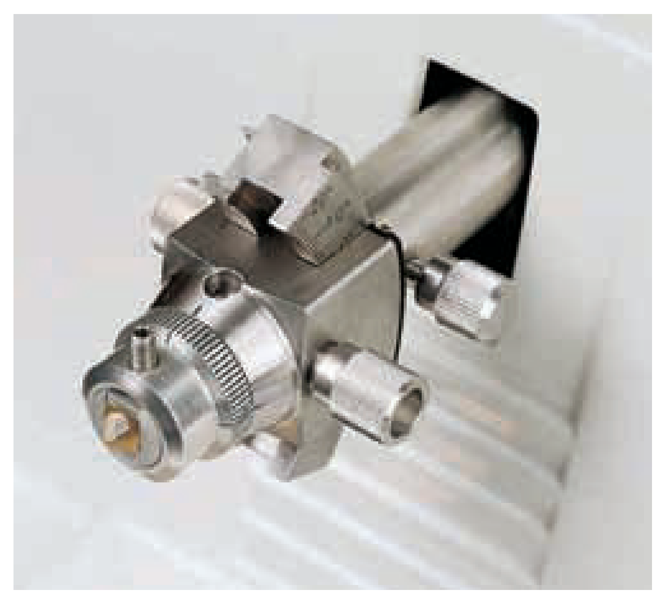
Los fijadores químicos son muy eficaces en la estabilización de muchas estructuras dentro de las células, pero tienen dos efectos. En primer lugar, son lentos; la difusión del fijador en la muestra para fijar sus estructuras requiere una mínima cantidad de tiempo. En segundo lugar, los fijadores químicos a menudo extraen componentes celulares (a menudo se pierden durante la fijación algunas estructuras pequeñas dentro de las células). La **criofijación**, que generalmente consiste en una congelación rápida (20 ms) de una muestra bajo condiciones de alta presión, evita estos problemas. Esta *congelación a alta presión* es necesaria, ya que sin ella se forman cristales de hielo dentro de la muestra lo que produce daños en sus estructuras. En la mayoría de los protocolos, la congelación a alta presión es seguida por una *criosustitución*. Durante esta sustitución, el agua de la muestra es reemplazada muy lentamente por un solvente orgánico, como la acetona, durante un periodo de días. La muestra resultante se puede procesar para su inclusión y cortado de la misma forma en que se procesan las muestras fijadas químicamente.

El tejido posteriormente se pasa a través de una serie de soluciones de alcohol que lo deshidratan, y posteriormente se sumerge en una solución de un disolvente como acetona u óxido de propileno para prepararlo para su inclusión en una resina líquida plástica de tipo epoxi. Después de que el plástico se ha infiltrado en la muestra, ésta se coloca en un molde y se calienta en una estufa para endurecer el plástico. Posteriormente la muestra incluida es cortada para obtener secciones ultrafinas utilizando un instrumento llamado **ultramicotomo** (Figura A.28a). La muestra se coloca firmemente en el brazo del ultramicotomo, el cual la avanza en incrementos pequeños hacia una cuchilla de vidrio o de diamante (Figura A.28). Cuando el bloque alcanza la cuchilla, se cortan secciones ultrafinas de la superficie del bloque. Las secciones flotan en la superficie del agua desde donde se puedan montar sobre rejillas circulares de cobre. Las rejillas están formadas por un entramado de hilos de cobre muy finos, que sujetan la muestra al tiempo que se forman aberturas entre los hilos adyacentes a través de los cuales se puede observar la muestra.

Una vez que se disponen en la rejilla, normalmente las secciones se tiñen de nuevo, esta vez con soluciones que



(a) Ultramicrótomo



(b) Brazo del ultramicrótomo

Figura A.28 Ultramicrótomo. (**a**) Fotografía de un ultramicrótomo. (**b**) Visión cercana del brazo de un ultramicrótomo que muestra una pieza histológica en un bloque de plástico montado en el extremo del brazo. A medida que el brazo del ultramicrótomo se mueve hacia arriba y hacia abajo, el bloque avanza en incrementos pequeños y se cortan secciones ultrafinas de la superficie del bloque con una cuchilla de diamante.

contienen plomo y uranio. Este paso incrementa el contraste de la muestra ya que el plomo y el uranio confieren aún una densidad electrónica mayor a regiones específicas de la célula. Después de esta tinción, la muestra está preparada para ser observada o fotografiada en un TEM.

Se pueden localizar moléculas en micrografías electrónicas con radioisótopos o anticuerpos

En nuestra exposición sobre microscopía óptica describimos cómo se puede emplear la autorradiografía microscópica para localizar moléculas radiactivas dentro de las células. La autorradiografía se puede también aplicar a la microscopía electrónica de transmisión con algunas pequeñas diferencias. Para el TEM, la muestra que contiene componentes marcados radiactivamente se examina simplemente en secciones ultrafinas sobre rejillas de cobre en lugar de en secciones finas montadas en portaobjetos de vidrio.

También describimos cómo se pueden emplear anticuerpos marcados con fluorescencia en microscopía óptica para localizar componentes celulares específicos. De la misma manera, se pueden usar anticuerpos en la técnica de microscopía electrónica llamada inmunomicroscopía electrónica (inmuno EM). La fluorescencia no se puede visualizar en el microscopio electrónico y para visualizar los anticuerpos éstos deben estar unidos a sustancias densas a los electrones y por lo tanto visibles como puntos opacos. Una de las aproximaciones más comunes es acoplar las moléculas anticuerpo con partículas de oro coloidal. Cuando las secciones ultrafinas de tejidos se tiñen con anticuerpos marcados con oro dirigidos contra diversas proteínas, la microscopía electrónica puede desvelar la localización subcelular de estas proteínas con gran precisión (Figura A.29).

Se puede emplear la microscopía correlativa para cubrir el espacio entre las microscopías óptica y electrónica

La inmunotinción de muestras fijadas y las técnicas de imagen de células vivas que expresan proteínas marcadas con GFP son herramientas poderosas en el arsenal de los biólogos celulares, ya que proporcionan información importante sobre la localización de los componentes celulares. Sin embargo, debido a que la longitud de onda de la luz visible es grande, la microscopía óptica tiene límites inherentes. En contraposición la microscopía electrónica de transmisión proporciona visiones increíblemente detalladas de las cé-



Figura A.29 Utilización de anticuerpos marcados con oro en microscopía electrónica. Células de la bacteria *E. coli* que fueron teñidas con anticuerpos marcados con oro, dirigidos contra una proteína de la membrana plasmática. Los pequeños granos oscuros, distribuidos alrededor de la periferia de la célula, son las moléculas de anticuerpo marcadas con oro.

lulas, pero estas células deben estar fijadas químicamente o congeladas rápidamente antes de su procesamiento para TEM. Una aproximación poderosa que unifica estas dos formas de examinar las estructuras celulares es la **microscopía correlativa**. En la microscopía correlativa se captan imágenes dinámicas de una célula empleando microscopía óptica, a menudo usando anticuerpos y/o GFP. La misma célula se procesa posteriormente y se visualiza empleando EM. Generalmente se emplea inmunoEM para determinar la localización de la proteína con una alta resolución (Figura A.30). La microscopía correlativa establece así un puente entre las imágenes dinámicas de microscopía óptica y las imágenes detalladas que solamente se pueden adquirir mediante EM.

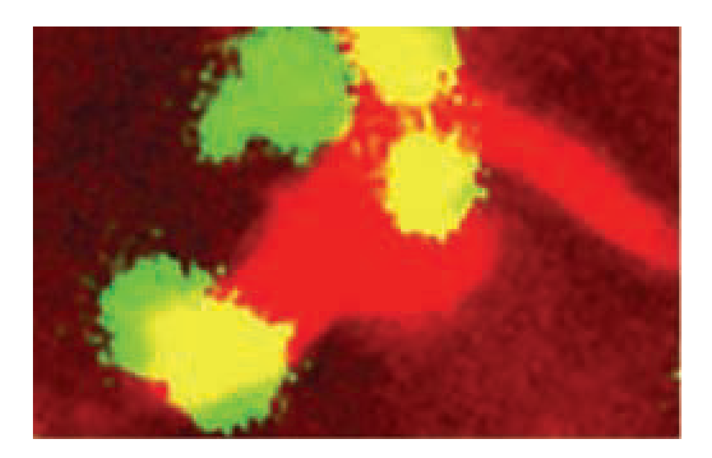




Figura A.30 Microscopía de correlación. *(Izquierda)* Sección fina de la faringe (estructura muscular para la alimentación) de un *C. elegans* adulto (un nematodo) visualizado mediante microscopía confocal. La señal verde es una proteína unida a la proteína fluorescente verde (GFP) que se expresa en las uniones entre las células epiteliales de la faringe. El rojo se muestra una imagen coloreada de la luz reflejada de la sección. *(Derecha)* La misma sesión después de procesarse para inmunoEM, usando un anticuerpo que reconoce GFP. Las partículas de oro se localizan en las mismas regiones que emiten la señal fluorescente. Vista a mayores aumentos (recuadro) que muestra dónde se localizan las partículas de oro en relación con las uniones entre las células (TEM).

La tinción negativa puede resaltar pequeños objetos en relieve en contraste con un fondo teñido

Aunque el cortado de tejidos en secciones ultrafinas en la forma más común de preparar muestras para microscopía electrónica de transmisión, se dispone de otras técnicas para fines particulares. Por ejemplo, la forma y la apariencia de la superficie de objetos muy pequeños, como virus u orgánulos aislados, se pueden examinar sin seccionar la muestra. En la técnica de **tinción negativa**, que es una de las técnicas más simples en microscopía electrónica de transmisión, las muestras intactas se visualizan simplemente en relieve en contraste con un medio teñido intensamente.

Para realizar una tinción negativa la rejilla de cobre debe ser inicialmente cubierta con una película de plástico muy fina. Entonces se suspende la muestra en una pequeña gota de líquido que se aplica sobre la superficie de plástico y se deja secar al aire. Una vez que la muestra se ha secado en la rejilla se aplica a la superficie de la película una gota de colorante como acetato de uranilo o ácido fosfotúngsico. Los bordes de la rejilla se hacen contactar en diversos puntos con papel de filtro para absorber el exceso de colorante. Esto deja al colorante por debajo y alrededor de la muestra y de sus características ultraestructurales. Cuando se visualiza en un TEM se observa la muestra en *contraste negativo* ya que el fondo es oscuro y muy teñido, mientras que la muestra está menos teñida (Figura A.31).

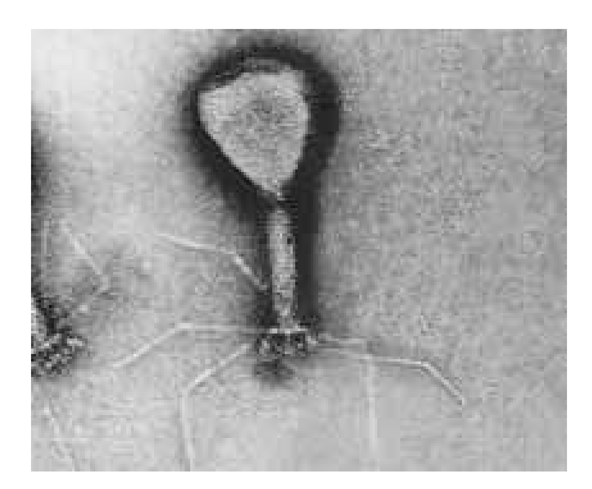


Figura A.31 Tinción negativa. Micrografía electrónica de un bacteriofago visto en una preparación con tinción negativa. Esta muestra simplemente se sumergió en un colorante electrodenso lo que permite su visualización en relieve en contraste con el medio intensamente marcado (TEM).

Las técnicas de sombreado emplean vapor de metal vaporizado sobre la superficie de la muestra

La técnica de sombreado consiste en vaporizar una capa fina de un metal electrodenso, como oro o platino, con un cierto ángulo sobre la superficie de la muestra biológica, y permite visualizar partículas aisladas como macromoléculas (Figura A.32). La Figura A.33a ilustra la técnica de sombreado. La muestra se extiende primero sobre una superficie limpia de mica y se deja secar (paso ①). Entonces se coloca en un **evaporador de vacío**, un recipiente en forma de campana en el que se crea un vacío mediante un sistema parecido al del microscopio electrónico (Figura A.33b). Dentro del evaporador hay también dos electrodos, uno de ellos consiste en un bastón de carbono localizado directamente sobre la muestra y el otro en un cable metálico localizado con un ángulo de alrededor de 10°-45° con respecto a la muestra.

Después de crearse el vacío en el evaporador, se aplica corriente al electrodo metálico, produciendo la evaporación del metal pesado el cual se deposita sobre la superficie de la muestra (Figura A.33, ②). Debido a que el electrodo que emite metal está posicionado con un ángulo con respecto a la muestra, el metal se deposita solamente sobre un



Figura A.32 Sombreado. Micrografía electrónica de partículas del virus mosaico del tabaco visualizadas con la técnica del sombreado. En esa técnica, se vaporiza metal pesado con un ángulo sobre la muestra, lo que produce una acumulación de metal en un lado de cada partícula viral, y una región de sombra que carece de metal en el otro lado (TEM).

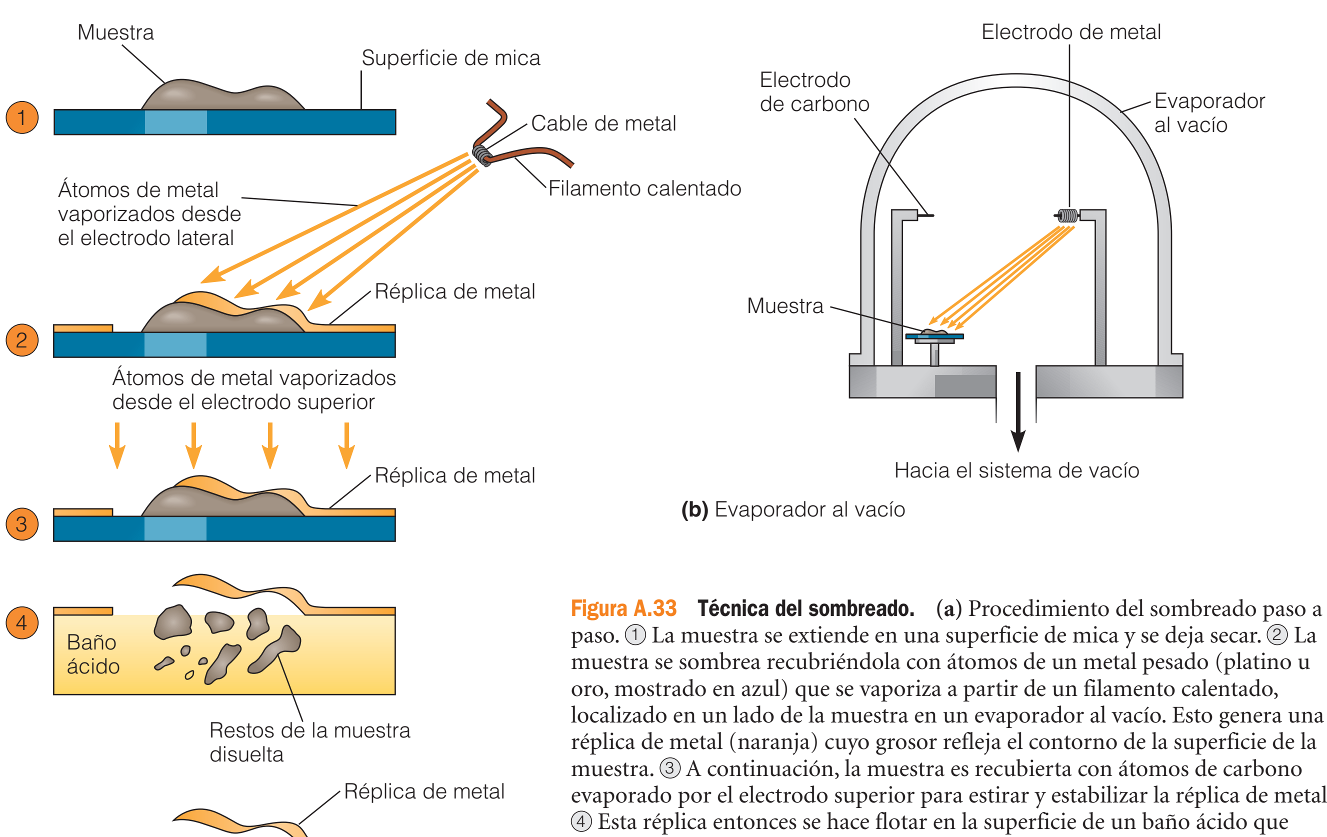


Figura A.33 Técnica del sombreado. (**a**) Procedimiento del sombreado paso a paso. ① La muestra se extiende en una superficie de mica y se deja secar. ② La muestra se sombrea recubriéndola con átomos de un metal pesado (platino u oro, mostrado en azul) que se vaporiza a partir de un filamento calentado, localizado en un lado de la muestra en un evaporador al vacío. Esto genera una réplica de metal (naranja) cuyo grosor refleja el contorno de la superficie de la muestra. ③ A continuación, la muestra es recubierta con átomos de carbono evaporado por el electrodo superior para estirar y estabilizar la réplica de metal. ④ Esta réplica entonces se hace flotar en la superficie de un baño ácido que disuelve la muestra dejando limpia la réplica de metal. ⑤ La réplica se lava y se recoge en una rejilla de cobre para su posterior visualización en un TEM. (**b**) Evaporador de vacío en el que se realiza el sombreado. El electrodo de carbono está localizado directamente sobre la muestra, mientras que el electrodo de metal pesado está desplazado lateralmente.

lado de la muestra generando una réplica de la superficie. La cara opuesta de la muestra permanece sin teñir; esta región sin teñir crea el efecto de «sombreado».

Entonces se usa un electrodo que libera carbón para recubrir la muestra con carbono vaporizado, lo que proporciona estabilidad y soporte a las réplicas de metal ③. A continuación, el soporte de mica que contiene la muestra se extrae del evaporador de vacío y se sumerge suavemente bajo la superficie del agua haciendo que la réplica flote y se desprenda de la superficie de mica. La réplica se transfiere a un baño ácido, que disuelve los restos de la muestra, y deja una réplica limpia de metal de la muestra ④. La réplica se transfiere entonces a una rejilla de cobre estándar ⑤ para su visualización con el microscopio electrónico de transmisión.

Para visualizar moléculas purificadas como de DNA o de RNA comúnmente se emplea un procedimiento relacionado. En esta técnica, se extiende una solución de DNA y/o RNA en una interfase aire-agua, creando una monocapa molecular que se recoge como una fina película que es visualizada al depositar uniformemente metal pesado sobre ella.

La criofractura y el grabado por congelación son útiles para el estudio del interior de las membranas

La criofractura es un procedimiento de preparación de la muestra completamente diferente de los métodos descritos hasta ahora. En lugar de cortar secciones uniformes a través de la muestra de tejido (o de teñir material sin seccionar), las muestras se congelan rápidamente a la temperatura del nitrógeno líquido o de helio líquido, se someten al vacío, y se golpean con el borde de una cuchilla afilada. Las muestras congeladas a temperaturas tan bajas son demasiado duras para ser seccionadas. Por el contrario, se fracturan a través de las líneas de debilidad natural —en la mayor parte de los casos el interior hidrofóbico de las membranas—. Entonces se emplea el sombreado con platino/carbono para crear una réplica de la superficie fracturada.

En la Figura A.34 se ilustra la criofractura. Tiene lugar en un evaporador de vacío modificado con una cuchilla interna de micrótomo que se emplea para fracturar la muestra congelada. La temperatura del soporte de la muestra, del brazo del micrótomo y de la cuchilla se controla de manera precisa. Las muestras están generalmente fijadas antes de la criofractura, aunque algunos tejidos vivos se pueden congelar lo suficientemente rápido para mantenerlos en condiciones prácticamente iguales a cuando estaban vivos. Debido a que las células tienen gran cantidad de agua, las muestras se tratan habitualmente con un anticongelante, como el glicerol, que confiere *crioprotección*, esto es, reduce la formación de cristales de hielo durante la congelación.

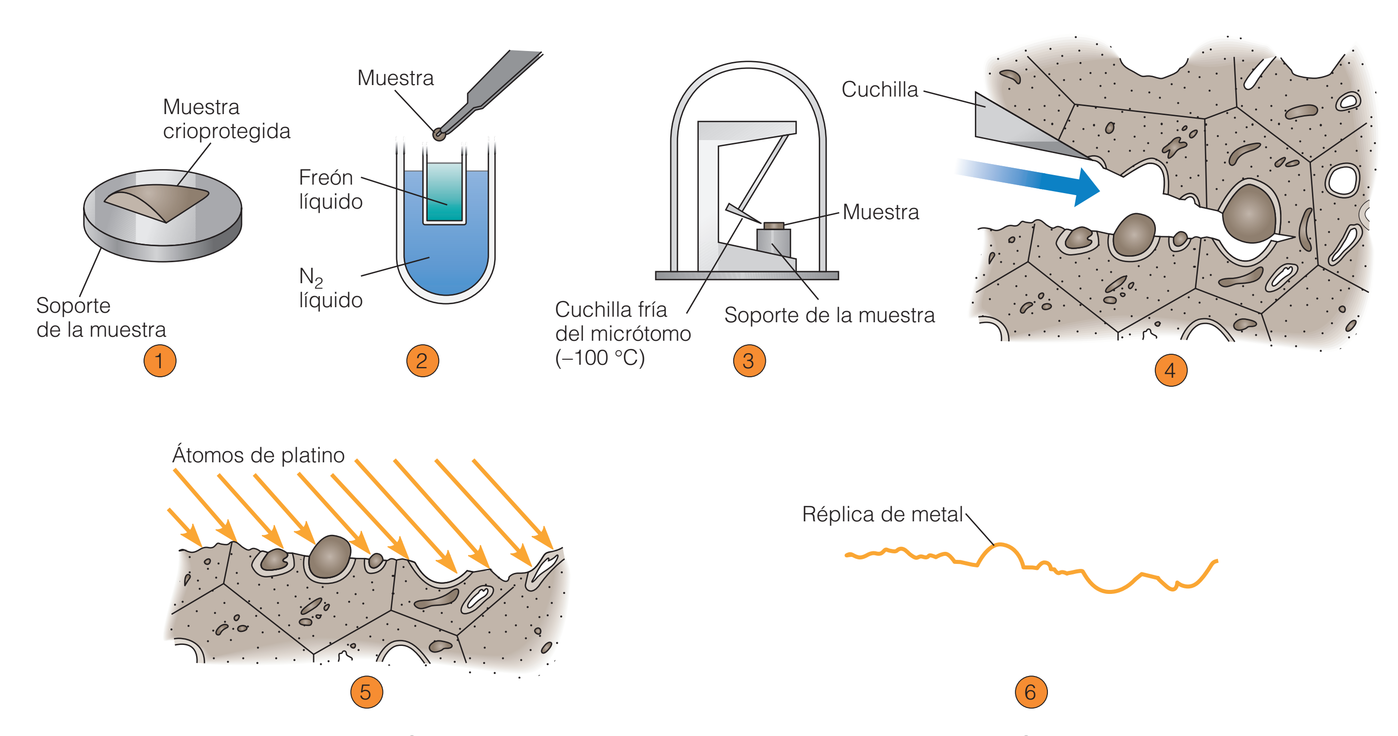


Figura A.34 Técnica de criofractura. ① Una muestra crioprotegida se monta en un soporte metálico. ② La muestra montada se sumerge en freón líquido enfriado con nitrógeno líquido. ③ La muestra congelada se transfiere a un evaporador al vacío y se ajusta a una temperatura de −100 °C. ④ La muestra se fractura con un golpe de la cuchilla de microtomo. El plano de fractura pasa a través del interior de las bicapas lipídicas cuando esto es posible, ya que ésta es la línea de menor resistencia a través de la muestra congelada. ⑤ La muestra fracturada se sombrea con platino y carbono, como en la Figura A.33, para hacer una réplica de metal de la muestra. ⑥ La réplica de metal se examina en un TEM.

La muestra crioprotegida se monta en una mordaza (Figura A.34, paso ①) y se sumerge rápidamente en freón enfriado con nitrógeno líquido ②. Este procedimiento reduce también la formación de cristales de hielo en las células. Cuando se dispone la muestra sobre la mordaza en el evaporador de vacío ③ se establece un alto vacío y se ajusta la temperatura de la mordaza alrededor de −100 °C, y la muestra congelada se fractura con un golpe de la cuchilla de micrótomo ④. Entonces se hace una réplica de la muestra fracturada mediante sombreado de platino y carbono como se ha descrito en la sección anterior ⑤ y la réplica está lista para observarse en el TEM ⑥.

Las membranas criofracturadas aparecen como superficies lisas salpicadas con **partículas intremembranosas (IMPs)** que se distribuyen en la membrana o bien al azar o se organizan en complejos ordenados. Estas partículas son proteínas integrales de membrana que han permanecido en una u otra monocapa al pasar el plano de fractura por el interior de la membrana.

La micrografía electrónica de la Figura A.35 muestran las dos caras de la membrana plasmática observadas por criofractura. **La cara P** es la cara interior de la monocapa interna; se denomina cara P porque está en el lado *protoplásmico* de la membrana. La **cara E** es la cara interior de la monocapa externa; se llama cara E porque está en el lado *exterior* de la membrana. Observe cómo la cara P tienen muchas más partículas intramembranosas que la cara E. En general, la mayor parte de las partículas de la membrana permanecen en la monocapa interna cuando el plano de fractura pasa por el centro de una membrana.

Para que las caras P y E aparezcan cara a cara, en la Figura A.35, el plano de fractura debe pasar a través de dos células vecinas, de forma que una célula pierda su citoplasma y la monocapa interna de su membrana plasmática para exponer la cara E, mientras que la otra célula debe perder la monocapa externa de su membrana plasmática y el espacio intercelular asociado para exponer la cara P. De acuerdo con esto, las caras E están siempre separadas de las caras P de las células adyacentes por un «escalón» (indicado con flechas en la Figura A.35) que representa el grosor del espacio intercelular.

Existe una técnica muy relacionada llamada **grabado por congelación**, que añade un paso adicional respecto a la criofractura y permite aportar más información. A continuación de la fractura de la muestra, pero antes del sombreado, se dispone el brazo del micrótomo directamente sobre la muestra durante un periodo corto de tiempo (desde unos pocos segundos a algunos minutos). Esta maniobra produce la evaporación (sublimación) de una pequeña cantidad de agua de la superficie de la muestra sobre la superficie de la cuchilla, y esta sublimación produce un efecto de *grabado* que consiste en la acentuación de los detalles de la superficie. El grabado breve mejora la visualización de la superficie de la membrana externa, que de otra forma estaría cubierta con hielo y es difícil de visualizar en una muestra típica de criofractura.

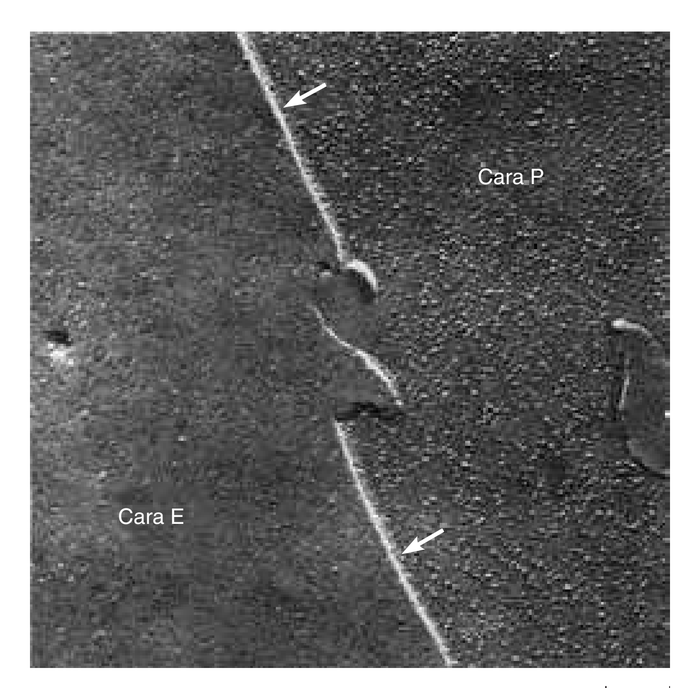


Figura A.35 Criofractura de la membrana plasmática. Esta micrografía electrónica muestra las caras expuestas de las membranas plasmáticas de dos células endocrinas adyacentes del páncreas de una rata tal y como se observan mediante criofractura. La cara P es la superficie interna de la monocapa lipídica en el lado protoplásmico de la membrana plasmática. La cara E es la superficie interna de la monocapa lipídica en el lado externo de la membrana plasmática. La cara P es mucho más rica en partículas intramembranosas que la cara E. Las flechas indican el «escalón» por el que pasó el plano de fractura del interior de la membrana plasmática de una célula al interior de la membrana plasmática de la célula vecina. Por lo tanto, este escalón representa el grosor del espacio intracelular (TEM).

Mediante la utilización de técnicas de congelación ultrarrápida para minimizar la formación de cristales de hielo durante la congelación, y mediante la inclusión de un crioprotector volátil como el metano líquido, que se sublima muy rápidamente hacia una superficie fría, el periodo de grabado se puede prolongar y se puede eliminar una capa de hielo más profunda, exponiendo de esta forma las estructuras localizadas a mayor profundidad dentro del interior celular. Esta modificación llamada **grabado profundo** proporciona una visión fascinante de la estructura celular. El grabado profundo ha sido especialmente útil en la exploración del citoesqueleto y en el examen de sus conexiones con otras estructuras de la célula.

La estereomicroscopía electrónica permite la visualización de muestras en tres dimensiones

Los microscopistas electrónicos frecuentemente quieren visualizar las muestras en tres dimensiones. El sombreado, la criofractura y la microscopía electrónica de barrido son

técnicas útiles para este fin, así como otra técnica especializada llamada **estereomicroscopía electrónica**. En la estereomicroscopía electrónica se obtiene información tridimensional fotografiando la misma muestra desde dos ángulos ligeramente diferentes. Esto se consigue usando una mordaza especial que puede ser inclinada con respecto a las de electrones. La muestra se inclina inicialmente en una dirección y se fotografía, y después se inclina la misma magnitud en la dirección opuesta y se fotografía de nuevo.

Las dos micrografías se montan cara a cara como un *estéreo par*. Cuando se observa un estéreo par a través de un visor estereoscópico, el cerebro emplea dos imágenes independientes para construir una visión tridimensional que ofrece una sensación intensa de profundidad de la estructura que se está investigando. La Figura A.36 es un estéreo par del cromosoma politénico de *Drosophila,* obtenido mediante microscopía electrónica de alto voltaje. Usando un visor estereoscópico o permitiendo que sus ojos fundan las dos imágenes visualmente se crea una visión tridimensional del cromosoma.

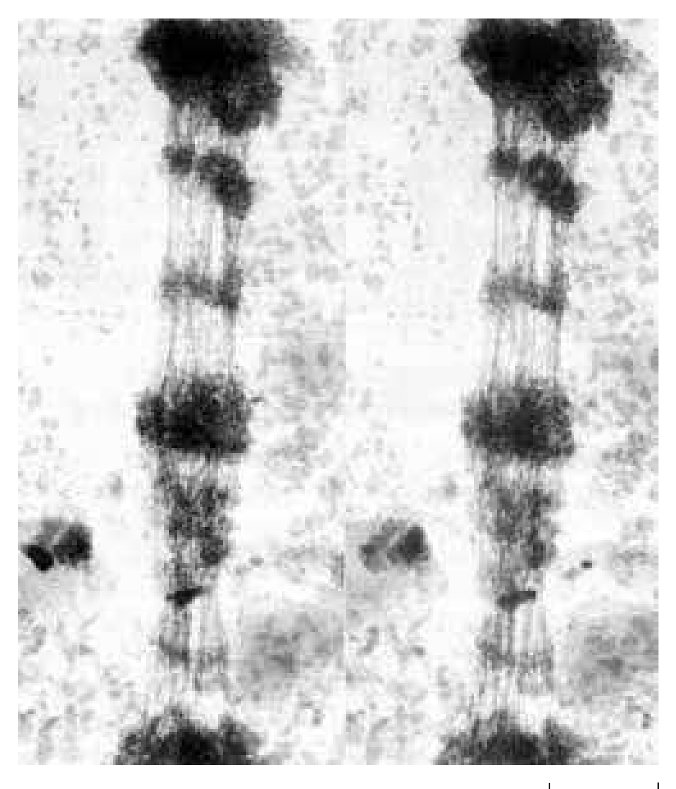


Figura A.36 Estereomicroscopía electrónica. El cromosoma politénico que se observa en esta micrografía electrónica de alto voltaje se muestra como un estéreo par de fotos que se pueden fundir ópticamente para generar una imagen tridimensional. Las dos fotografías se tomaron inclinando el soporte de la muestra primero 5° a la derecha y después 5° a la izquierda respecto al haz de electrones. Para una vista tridimensional se puede examinar el estéreo par con un visor estereoscópico, fusionando las dos micrografías en una imagen simple (HVEM).

La preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido requiere la fijación pero no el seccionamiento

Cuando se prepara una muestra para microscopía electrónica de barrido el objetivo es preservar las características estructurales de la superficie celular y tratar al tejido de forma que se minimice el daño causado por el haz de electrones. El procedimiento es similar a la preparación de secciones ultrafinas en la microscopía electrónica de transmisión, pero sin el paso de cortado. El tejido está fijado en aldehídos, postfijado en tetraóxido de osmio y deshidratado mediante el procesamiento a través de series de soluciones de alcoholes. El tejido entonces se sumerge en un fluido como dióxido de carbono líquido en un recipiente de metal pesado llamado **secador de punto crítico**, que se emplea para secar la muestra en condiciones de presión y temperatura controladas. Esto ayuda a mantener la estructura de las superficies del tejido en casi las mismas condiciones que tenían antes de la deshidratación.

La muestra seca se pega entonces sobre una mordaza metálica con una pasta metálica. La muestra montada es recubierta con una capa de oro o una mezcla de oro y paladio utilizando una forma de evaporación al vacío modificada llamada **recubrimiento por bombardeo** (**sputter coating**). Una vez que la muestra se ha montado y recubierto está preparada para ser examinada en un SEM.

Otros métodos de imagen

Las microscopías óptica y electrónica son técnicas de imagen directa, en las que los fotones o los electrones producen imágenes de una muestra. Sin embargo, otras técnicas de imagen son indirectas. Para comprender lo que queremos decir por imagen indirecta suponga que le dan un objeto para manipular con los ojos cerrados. Usted puede sentir seis superficies planas, 12 bordes y ocho esquinas y si usted después puede dibujar lo que ha percibido, el objeto resultante será una caja. Esto es un ejemplo de un procedimiento indirecto de imagen.

Los dos métodos indirectos de imagen que describimos son la *microscopía de barrido de sonda y la difracción de rayos X*. Ambas aproximaciones tienen el potencial de mostrar las estructuras moleculares con una resolución casi atómica, 10 veces mejor que el mejor microscopio electrónico. Tienen algunos defectos que limitan su utilidad para muestras biológicas, pero cuando estas técnicas se aplican con éxito, las imágenes resultantes proporcionan una información única acerca de la estructura molecular que no se puede obtener empleando técnicas convencionales de microscopía.

La microscopía de barrido de sonda revela las características de la superficie de moléculas individuales

Aunque el «barrido» se produce tanto en la microscopía electrónica de barrido como en la microscopía de barrido

de sonda, los dos métodos son muy diferentes. El primer ejemplo de microscopía de barrido de sonda denominado microscopio de efecto túnel (STM) fue desarrollado al principio de los años 80 con el fin de explorar la estructura superficial de muestras a nivel atómico. El STM utiliza una sonda muy pequeña que no emite un haz de electrones, sino que por el contrario posee una punta hecha de un material conductor como el platino-iridio. La punta de la sonda está extremadamente afilada estando compuesta idealmente por un único átomo. Mediante el control preciso de un circuito electrónico esta punta se puede mover en tres dimensiones sobre una superficie. Las dimensiones x e y barren la superficie, mientras que la dimensión z controla la distancia de la punta sobre la superficie (Figura A.37).

A medida que la punta del STM se mueve a lo largo de la superficie de una muestra, se aplican voltajes que oscilan entre unos pocos milivoltios y algunos voltios. Si la punta está lo suficientemente cerca de la superficie, y la superficie es conductora eléctricamente, empezarán a fluir o a desplazarse electrones a través del espacio o la brecha existente entre la sonda en la muestra. El flujo depende en gran medida de la distancia, de forma que incluso las pequeñas irregularidades en el rango del tamaño de átomos sencillos afectarán a la velocidad del flujo de electrones. A medida que la sonda barre la muestra, la punta de la sonda se mueve hacia arriba y hacia abajo automáticamente para mantener un flujo constante de electrones a través de la brecha. Un ordenador mide este movimiento y usa la información para generar un mapa de la superficie de la muestra que puede verse en un monitor de vídeo.

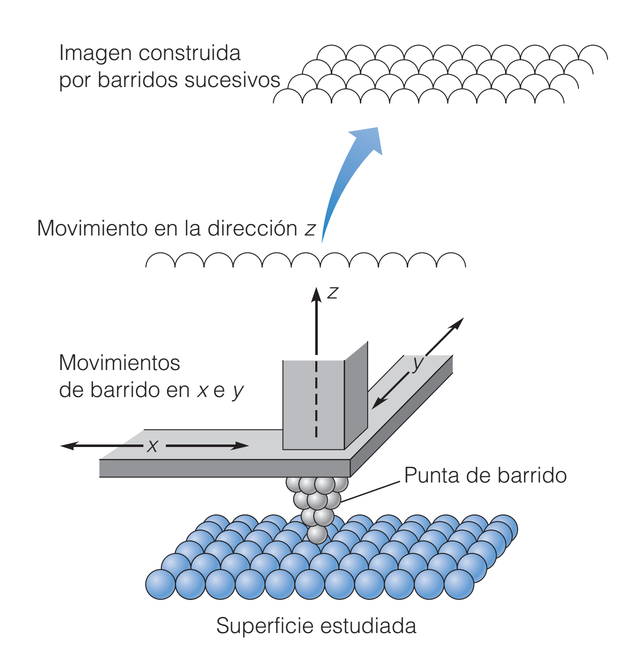


Figura A.37 **Microscopía electrónica de efecto túnel.** El microscopio de efecto túnel (STM) emplea métodos electrónicos para mover una punta metálica a lo largo de la superficie de una muestra. En esa ilustración la punta no está dibujada a escala; la punta está compuesta de manera ideal únicamente por uno o unos pocos átomos, mostrados aquí como esferas. Se establece un voltaje eléctrico entre la punta y la superficie de la muestra. A medida que la punta hace un barrido de la muestra en las direcciones x e y, ocurre un efecto túnel de los electrones a un ritmo dependiente de la distancia entre la punta y la primera capa de átomos de la superficie. El instrumento está diseñado para mover la punta en la dirección z con objeto de mantener un flujo constante de corriente. El movimiento es por lo tanto una función de la corriente de electrones y se representa en una pantalla de vídeo. Los barridos sucesivos construyen de esta forma una imagen de la superficie a resolución atómica.

Pese al enorme poder del STM, tiene dos limitaciones: la muestra debe ser un conductor eléctrico, y la técnica únicamente proporciona información de los electrones asociados con la superficie de la muestra. Los investigadores han comenzado por lo tanto a desarrollar otros tipos de microscopios de barrido de sonda que hacen un barrido como en el STM pero que miden distintos tipos de interacciones entre la punta y la superficie de la muestra. Por ejemplo, en el *microscopio de fuerza atómica* (AFM), la punta del escáner se empuja contra la superficie de la muestra. A medida que se barre la muestra, se mueve hacia arriba y hacia abajo como si se desplazase sobre colinas y valles microscópicos formados por los átomos presentes en la superficie de la muestra. Se han diseñado diversos microscopios de barrido de sonda para detectar propiedades como la fricción, el calor y el sonido.

Una de las aplicaciones potencialmente más importantes de la microscopía de barrido de sonda es la medida de los cambios dinámicos en la conformación de las biomoléculas en funcionamiento. Consideré por ejemplo lo impresionante que podría ser «visualizar» el cambio de forma de una única molécula de una enzima a medida que hidroliza ATP para producir la energía necesaria para transportar iones a través de membranas. Esta «visualización molecular» es ahora una posibilidad enteramente en la esfera real. Es incluso posible usar una forma modificada de la microscopía de fuerza atómica para estirar directamente biomoléculas grandes para medir sus propiedades mecánicas.

La dirección de rayos X permite la determinación de la estructura tridimensional de las macromoléculas

Aunque la **difracción de rayos X** no incluye ninguna forma de microscopía, es un método tan importante para investigar la estructura tridimensional de las moléculas individuales que la incluimos aquí. Este método reconstruye imágenes a partir de los patrones de difracción de rayos X que pasan a través de una muestra cristalina o fibrosa, revelando la estructura molecular con una resolución de nivel atómico.

Una buena forma de entender la difracción de rayos X es establecer una analogía con la luz visible. Como discutimos anteriormente la luz tiene algunas propiedades que se describen de forma óptima como una onda. Cuando ocurren fenómenos ondulatorios en la naturaleza se pueden

producir interacciones entre las ondas. Si las ondas procedentes de dos orígenes entran en fase, su amplitud total es aditiva (*interferencia constructiva*); si están fuera de fase, su amplitud se reduce (*interferencia destructiva*). Este efecto se puede ver cuando la luz pasa a través de dos orificios en una pieza de material opaco y entonces incide sobre una superficie blanca. Se produce un patrón de interferencias, con regiones oscuras en las regiones en las que las ondas de luz están fuera de fase y regiones claras donde están en fase (Figura A.38). Si la longitud de onda de la luz (λ) es conocida, uno puede medir el ángulo α entre el rayo original y el primer pico de difracción y entonces calcular la distancia d entre los dos orificios mediante la fórmula:

$$d = \frac{\lambda}{\text{sen } \alpha}. \quad \textbf{(A.6)}$$

Se puede usar esta misma aproximación para calcular la distancia entre átomos en cristales o fibras de proteínas o ácidos nucleicos. En lugar de una hoja de papel con dos agujeros, imagine que tenemos múltiples capas de átomos organizados en un cristal o una fibra. En lugar de luz visible, que tiene una longitud de onda demasiado grande para interaccionar con los átomos, emplearemos un haz estrecho de rayos X, con longitud de onda en el rango de las distancias interatómicas. A medida que los rayos X pasan a través de la muestra, reflejan planos de átomos, y los haces reflejados sufren interferencias constructivas y destructivas. Los rayos reflejados inciden sobre placas fotográficas detrás de la muestra generando patrones distintivos de difracción. Estos patrones son entonces analizados matemáticamente para deducir la estructura tridimensional de la molécula original. La Figura A.39 ilustra la utilización de esta técnica para reducir la estructura de doble hélice del DNA.

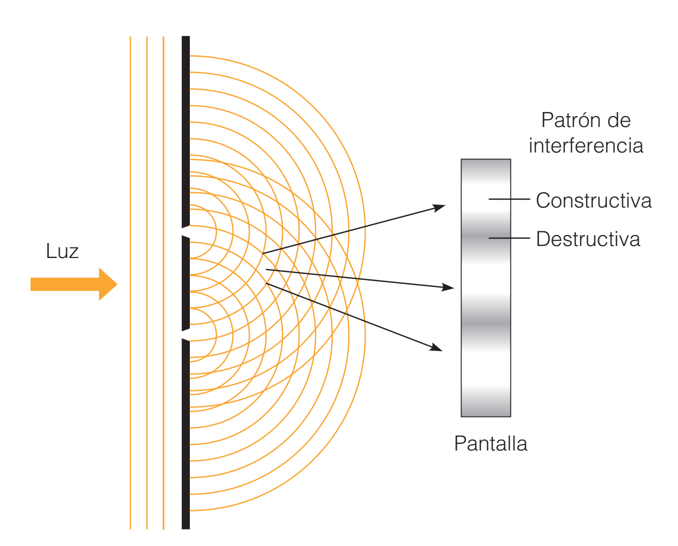
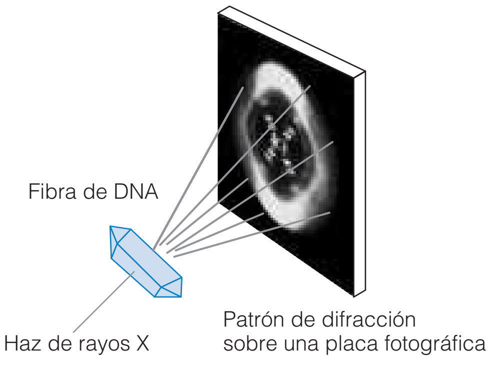
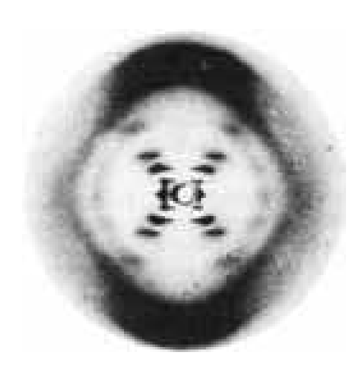


Figura A.38 Comprensión de los patrones de difracción. Cualquier energía con forma ondulatoria producirá patrones de interferencia si las ondas producidas a partir de dos o más fuentes se superponen en el espacio. Uno de los patrones más simples que se puede observar cuando la luz monocromática pasa a través de dos orificios vecinos e incide sobre una pantalla. Cuando la luz atraviesa los dos orificios, éstos actúan como fuentes de luz, irradiando ondas que inciden sobre una superficie blanca. En los puntos en los que las ondas están en la misma fase, aparece una superficie brillante (interferencia constructiva), pero cuando las ondas están fuera de fase se neutralizan entre ellas introducen zonas oscuras (interferencia destructiva).

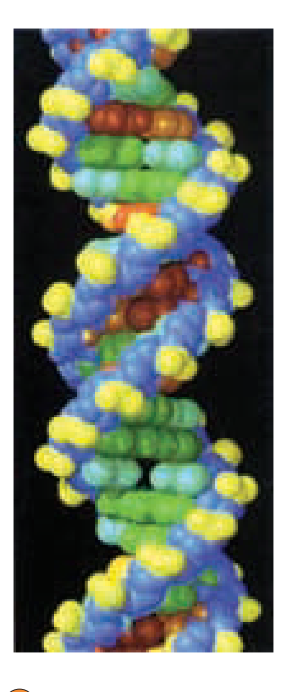
Figura A.39 Difracción de rayos X. Se puede utilizar la difracción de rayos X para analizar la estructura molecular con una resolución casi atómica. ① Los rayos X son difractados por los átomos de cristales o fibras de la misma forma que las ondas de luz son difractadas por los orificios. En la mayoría de los casos, las muestras de interés para los biólogos son proteínas o ácidos nucleicos. El ejemplo específico ilustrado en esta figura es una fibra de DNA. ② Los patrones de difracción resultantes son registrados fotográficamente y se pueden analizar matemáticamente para deducir la estructura molecular. Esta fotografía muestra el patrón de difracción de rayos X empleado por James Watson y Francis Crick para deducir la estructura molecular de la doble hélice del DNA. ③ Modelo gráfico de ordenador de la estructura en doble hélice del DNA.



① Los rayos X difractados por la fibra de DNA producen un patrón de difracción en una placa fotográfica.



② El patrón de difracción resultante se analiza matemáticamente.



③ Se deduce la estructura tridimensional de la molécula.

La técnica de difracción de rayos X fue desarrollada en 1912 por Sir William Bragg, que la empleó para establecer la estructura de cristales minerales relativamente simples. 40 años después, Max Perutz y John Kendrew encontraron formas de aplicar la difracción de rayos X a cristales de hemoglobina y mioglobina, proporcionando nuestra primera visión de la estructura de las proteínas. Desde entonces, se han cristalizado y analizado por difracción de rayos X numerosas proteínas y otras moléculas biológicas. Aunque las proteínas de membrana son mucho más difíciles de cristalizar que las proteínas analizadas generalmente por difracción de rayos X, Hatmut Michel y Johann Deisenhofer solucionaron este obstáculo en 1985 al cristalizar las proteínas del centro reacción fotosintético de las bacterias. Entonces continuaron para describir la organización molecular del centro reacción a una resolución de 0,3 nm, un logro que les hizo merecedores del Premio Nobel.

La crioEM establece un puente entre la cristalografía de rayos X y l amicroscopía electrónica

La cristalografía de rayos X ha proporcionado unas visiones sin precedentes de las moléculas biológicas a nivel atómico. Sin embargo, la cristalografía requiere grandes cantidades de moléculas purificadas. Además, la cristalografía de rayos X no está hasta el momento bien adaptada para analizar agregados macromoleculares grandes como por ejemplo los ribosomas (*véase* Figura 20.1). Una técnica que ayuda a rellenar este vacío es la **crioEM**. En la crioEM, se congelan rápidamente mediante criofijación moléculas o agregados macromoleculares purificados. La congelación rápida evita la formación de cristales de hielo. Por el contrario, las moléculas quedan embebidas en *hielo vítreo*, agua congelada no cristalina que preserva mejor las estructuras de las moléculas embebidas. La muestra es entonces visualizada en un microscopio electrónico a muy baja temperatura (−170 °C). A menudo, las muestras son rotadas y visualizadas desde numerosas orientaciones diferentes, las visiones rotadas resultantes se reconstruyen para proporcionar información tridimensional acerca de la muestra, un proceso conocido como *tomografía electrónica.* Para ver cómo funciona la crioEM junto a la cristalografía de rayos X considere la Figura A.40, en la que se ha combinado una imagen de crioEM de las subunidades ribosomales 30S y 50S y de un factor conocido como RF2 con la estructura detallada de RF2 obtenida a partir de datos de rayos X. Utilizando estas dos técnicas de manera conjunta, es posible ver cómo la estructura de la proteína posibilita que encaje en la estructura general del ribosoma para desempeñar su función.

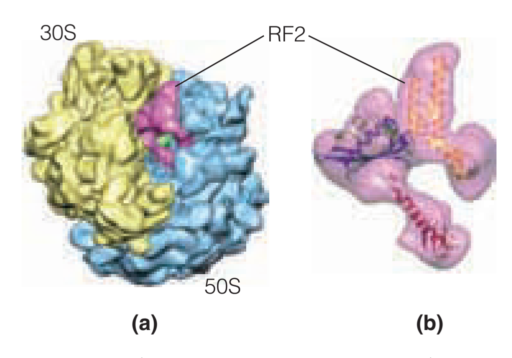


Figura A.40 Utilización de la crioEM y la cristalografía de rayos X para establecer un puente entre los niveles atómico y molecular. *(Izquierda)* Reconstrucción tridimensional de las subunidades 30S (amarillo) y 50S (azul) del ribosoma unidas al factor de liberación (RF2, en rosa) obtenida mediante crioEM. La cristalografía de rayos X proporciona una visión más detallada de RF2 *(derecha).* (Reproducido con el permiso de *Nature Publishing Group.*)

Bibliografía recomendada

Las referencias con importancia histórica están marcadas con •.

Referencias generales

Bradbury, S., B. Bracegirdle y S. Bradbury. *Introduction to Light Microscopy*. Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers, 1998.

Murphy, D. B. *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. New York: Wiley-Liss, 2001.

Herman, B., H. J. Tanke y B. Herman. *Fluorescence Microscopy*, 2nd ed. Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers, 1998.

Slayter, E. M. y H. S. Slayter. *Light and Electron Microscopy*. New York: Cambridge University Press, 1992.

Stoffler, D., M. O. Steinmetz y U. Aebi. Imaging biological matter across dimensions: From cells to molecules and atoms. *FASEB J.* 13 Suppl. 2 (1999): S195.

Microscopía óptica

•Ford, B. J. The earliest views. *Sci. Amer.* 278 (abril de 1998): 50.

Inoué, S. y K. R. Spring. *Video Microscopy: The Fundamentals,* 2nd ed. New York: Plenum, 1997.

Matsumoto, B., ed. *Cell Biological Applications of Confocal Microscopy,* 2nd ed. New York: Academic Press, 2002.

Potter, S. M. Vital imaging: Two photons are better than one. *Current Biology* 6 (1996): 1595.

Gerlich, D. y J. Ellenberg. 4D imaging to assay complex dynamics in live specimens. *Nat. Cell Biol.* Suppl. (2003): S14-S19.

Lippincott-Schwartz, J. y G. H. Patterson. Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* 300 (2003): 87-91.

Sako, Y. y T. Yanagida. Single-molecule visualization in cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* Suppl. (2003): SS1-SS5.

Stephens, D. J. y V. J. Allan. Light microscopy techniques for live cell imaging. *Science* 300 (2003): 82-86.

Steyer, J. A. y W. Almers. A real-time view of life within 100 nm of the plasma membrane. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (2001): 268-275.

Walker, S. A. y P. J. Lockyer. Visualizing Ras signaling in real-time. *J. Cell Sci.* 117 (2004): 2879-2886.

Wang, Y. L. Digital deconvolution of fluorescence images for biologists. *Methods Cell Biol.* 56 (1998): 305.

Zhang, J., R. E. Campbell, A. Y. Ting y R. Y. Tsien. Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (2002): 906-918.

Microscopía electrónica

Bozzola, J. J. y L. D. Russell. *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists,* 2nd ed. Boston: Jones and Bartlett, 1998.

Flegler, S. L., J. W. Heckman y K. L. Klomparens. *Scanning and Transmission Microscopy: An Introduction.* New York: Oxford Univ. Press, 1995.

•Heuser, J. Quick-freeze, deep-etch preparation of samples for 3-D electron microscopy. *Trends Biochem. Sci.* 6 (1981): 64.

Koster, A. J. y J. Klumperman. Electron microscopy in cell biology: integrating structure and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol. Suppl.* (2003): SS6–SS10.

Maunsbach, A. B. y B. A. Afzelius. *Biomedical Electron Microscopy: Illustrated Methods and Interpretations.* San Diego, CA: Academic Press, 1999.

•Orci, L. y A. Perrelet. Freeze-Etch Histology: *A Comparison Between Thin Sections and Freeze-Etch Replicas.* New York: Springer-Verlag, 1975.

•Satir, P. Keith R. Porter and the first electron micrograph of a cell. *Trends Cell Biol.* 7 (1997): 330.

Otras técnicas de imagen

Engel, A. y D. J. Muller. Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope. *Nat. Struct. Biol.* 7 (2000): 715.

Glusker, J. P. y K. N. Trueblood. *Crystal Structure Analysis: A Primer,* 2nd ed. Oxford, England: Oxford University Press, 1985.

Heyman, K. Better structures through synergy. *The Scientist* (13 de septiembre de 2004): 28-31.

•Kendrew, J. C. The three-dimensional structure of a protein molecule. *Sci. Amer.* 205 (diciembre de 1961): 96.

Marti, O. y M. Amrein. *STM and SFM in Biology.* San Diego: Academic Press, 1993.

Roberts, C. J., P. M. Williams, M. C. Davies, D. E. Jackson y S. J. B. Kendler. Atomic force microscopy and scanning tunneling microscopy: Refining techniques for studying biomolecules. *Trends Biotechnol.* 12 (1994): 127.



Glosario

A

A: *véase adenina.*

acetil CoA: compuesto de alta energía, de dos átomos de carbono, generado en la glucolisis y en la oxidación de ácidos grasos; se emplea para transferir átomos de carbono en el ciclo del ácido tricarboxílico.

acetilcolina: el más común de los neurotransmisores excitadores empleados en sinapsis del sistema nervioso periférico.

acetil transferasa de histonas (HAT): enzima que cataliza la adición de grupos acetilo a las histonas.

ácido desoxirribonucleico: *véase DNA*.

ácido fosfatídico: componente básico de los fosfoglicéridos; está formado por dos ácidos grasos y un fosfato, unidos a un glicerol por enlaces ester; intermediarios clave en la síntesis de otros fosfoglicéridos.

ácido graso: hidrocarburo de cadena larga, no ramificada y, por tanto anfipático, que tiene un grupo carboxilo en uno de sus extremos; generalmente tienen un número par de átomos de carbono y un número variable de insaturaciones.

ácido graso insaturado: molécula de ácido graso que contiene uno o más dobles enlaces.

ácido graso saturado: ácido graso sin enlaces dobles o triples, de forma que cada átomo de carbono de la cadena, tiene unido el máximo número posible de átomos de hidrógeno.

ácido nucleico: polímero lineal de nucleótidos unidos con un orden genético determinado. Cada nucleótido está compuesto por ribosa o desoxirribosa, un grupo fosfato y la base nitrogenada guanina, citosina, adenosina y timina (para el DNA) o uracilo (para el RNA). *Véase también DNA* y *RNA*.

ácido ribonucleico: *véase RNA*.

acoplamiento: relación entre procesos mutuamente dependientes, tales como el acoplamiento entre el transporte de electrones y la síntesis de ATP en el metabolismo respiratorio.

actina: principal proteína de los microfilamentos, presente en el citoesqueleto de células no musculares y en los filamentos finos del músculo esquelético; se sintetiza como un monómero globular (actina-G) que polimeriza en filamentos lineales largos (actina-F).

actina F: constituyente de los microfilamentos, formado por monómeros de actina G, que polimerizan en cadenas lineales largas.

actina G: forma monomérica globular de la actina, que polimeriza para formar actina F.

activación del sustrato: papel del centro activo de una encima, consistente en que el sustrato alcance su máxima reactividad, optimizando el ambiente químico para la catálisis.

acuaporina (AQP): canal proteico de membrana, que facilita la salida y entrada rápida de moléculas de agua, en células que requieren una alta tasa de intercambio, como las de los túbulos proximales del riñón.

adaptación homeoviscosa: alteración en la composición de los lípidos de membrana, que permite mantener más o menos constante la viscosidad, cuando se producen cambios en la temperatura ambiental.

adenilil ciclasa: enzima que cataliza la formación de AMP cíclico a partir de ATP; se localiza en la cara interna de la membrana plasmática de muchas células eucarióticas y se activa por interacciones específicas receptor-ligando de la cara externa de la membrana.

adenina (A): base nitrogenada designada químicamente como purina, que sirve como unidad de información, cuando está formando parte de una secuencia de bases en un ácido nucleico; se complementa, por puentes de hidrógeno, con las bases timina (T) y uracilo (U).

adenosín difosfato (ADP): adenosina con dos fosfatos unidos entre sí por un enlace fosfoanhidrido y por un enlace fosfoéster al carbono 5′ de una ribosa.

adenosín monofosfato (AMP): adenosina con un fosfato unido por un enlace fosfoester al carbono 5′ de una ribosa.

adenosín trifosfato (ATP): adenosina con tres fosfatos unidos entre sí por enlaces fosfoanhidrido,y por un enlace fosfoester al carbono 5′ de una ribosa; la energía contenida en los enlaces fosfoanhidrido, es la principal forma de almacenamiento energético en la mayoría de las células.

adhesión focal: puntos de anclaje entre las integrinas de la superficie celular y la matriz extracelular; en ellos se concentran las integrinas, que interaccionan con los haces de filamentos de actina, a través de varias proteínas enlazadoras.

ADP: *véase adenosín difosfato.*

adrenérgica, sinapsis: sinapsis que usa adrenalina o noradrenalina como neurotransmisor.

adrenérgico, receptor: cualquiera de los receptores ligados a proteínas G a los que se unen adrenalina, noradrenalina o ambas.

aerobio estricto: organismo que precisa obligatoriamente del oxígeno como aceptor de electrones y, por tanto, no puede vivir en condiciones anaeróbicas.

afinidad de un receptor: medida de la atracción química entre un receptor y su ligando.
agonista: sustancia que se une a un receptor, activándolo.
Akt: proteína quinasa implicada en la ruta de la PI3K-Akt; cataliza la fosforilación de diversas proteínas que suprimen la apoptosis e inhiben la parada del ciclo celular.
alelo: una de las dos o más formas alternativas de un gen.
alelo recesivo: alelo presente en el genoma, pero cuya expresión fenotípica sólo se produce en homocigosis.
almidón: polisacárido de reserva de plantas, formado por subunidades repetitivas de glucosa unidas por enlaces α(1?4) y en ocasiones α(1?6). Las dos formas principales de almidón son la amilosa, no ramificada y la amilopectina, que sí está ramificada.
alostérica, enzima: enzima que exhibe dos formas alternativas, cada una de ellas con diferente actividad biológica; la conversión entre los dos estados depende de la unión reversible de una pequeña molécula específica, el efector alostérico, a un lugar de regulación, llamado centro o sitio alostérico.
alostérica, regulación: control de una reacción por la conversión reversible de las dos formas de una enzima alostérica; es dependiente de efectores alostéricos.
alostérico, activador: pequeña molécula que se une al centro alostérico de una enzima, desplazando el equilibrio hacia el estado de alta afinidad de dicha enzima.
alostérico, centro: también llamado sitio alostérico o de regulación, es la región de una proteína a la cual se une selectivamente una pequeña molécula, que regula la actividad de la proteína; el centro alostérico es diferente del centro activo.
alostérico, efector: pequeña molécula que causa un cambio en el estado de una de una proteína alostérica, uniéndose a un sitio distinto del centro activo.
alostérico, inhibidor: pequeña molécula cuya unión al centro alostérico de una enzima, desplaza el equilibrio hacia el estado de baja afinidad de dicha enzima.
alternancia de generaciones: alternancia entre las formas haploide y diploide en el ciclo de vida de un organismo pluricelular.
amilopectina: forma ramificada de almidón, consistente en polímeros de glucosa unidos por enlaces glicosídicos $\alpha(1 \longrightarrow 4)$, alternando ocasionalmente (cada 12-25 unidades) con enlaces $\alpha(1 \longrightarrow 6)$ Estos últimos son el origen de las ramificaciones, que suelen estar formadas por unas 20-25 unidades, unidas en $\alpha(1 \longrightarrow 4)$.
amilosa: forma lineal de almidón consistente en unidades repetitivas de glucosa, unidas por enlaces glicosídicos $\alpha(1 \longrightarrow 4)$.
aminoácido: cada uno de los monómeros de las proteínas, formado por un ácido carboxílico, a cuyo carbono α se unen un grupo amino y un grupo R variable; normalmente, en las proteínas, aparecen 20 tipos de aminoácidos.
aminoacil, sitio: *véase sitio A.*
aminoacil t-RNA: molécula de t-RNA que porta un aminoácido unido a su extremo 3′.
aminoacil t-RNA sintetasa: enzima que une un aminoácido a su correspondiente molécula de t-RNA, usando energía proveniente de la hidrólisis de ATP.
amino-terminal: *véase N-terminal.*
AMP cíclico (cAMP): molécula de monofosfato de adenosina con el grupo fosfato unido por enlaces fosfodiéster a los carbonos 3′ y 5′; interviene en procesos de regulación génica, tanto en procariotas, como en eucariotas; en eucariotas es un segundo mensajero relacionado con varias moléculas de señalización, que activa a la proteína quinasa A.
AMP: *véase adenosín monofosfato.*
ampliación útil: medida de hasta cuánto se puede ampliar una imagen, de manera que una magnificación adicional, no proporciona más información.
amplificación génica: procedimiento para crear copias extra de genes, replicando secuencias específicas de DNA.
amplificador: secuencia del DNA que contiene un lugar para que los factores de transcripción activen dicha transcripción; la posición y orientación del amplificador en relación al promotor, puede variar significativamente, sin que ello interfiera en la capacidad de regular la transcripción.
anaerobio estricto: organismo que no puede usar el oxígeno como aceptor de electrones y, por tanto, precisa obligatoriamente de aceptores de electrones diferentes del oxígeno.
anafase A: movimiento de cromátidas a polos opuestos del huso, durante la anafase.
anafase B: movimiento de separación de los polos del huso mitótico, durante la anafase.
anafase: etapa de la mitosis (o meiosis) durante la cual las cromátidas (o cromosomas homólogos) se separan y dirigen a polos opuestos del huso mitótico.
anaplásico: pobremente diferenciado y de apariencia anormal.
aneuploidía: situación anómala en la que una célula posee un número incorrecto de cromosomas.
angiogénesis: crecimiento de nuevos vasos.
anillo contráctil: haz de filamentos de actina, con forma de cinturón, situado bajo la membrana plasmática y responsable del cierre del surco telofásico, durante la división de una célula animal.
antagonista: sustancia que se une a un receptor impidiendo su activación.
anticodon: triplete de nucleótidos localizado en uno de los lazos de una molécula de tRNA, que reconoce el codon apropiado del mRNA, por fenómenos de complementariedad de bases.
anticuerpo: proteínas producidas por linfocitos que se unen con extraordinaria especificidad a sustancias denominadas antígenos, provocando una respuesta inmunológica.
anticuerpo fluorescente: anticuerpo al cual se unen, covalentemente, colorantes fluorescentes, que permiten visualizar las moléculas del anticuerpo en el microscopio.
anticuerpo monoclonal: anticuerpo altamente purificado, dirigido contra un único antígeno, que es segregado por un clon de células productoras de anticuerpos.
antígeno: sustancia extraña o anormal que puede desencadenar una respuesta inmunológica.
antiporte: transporte acoplado de dos solutos a través de una membrana, que se mueven en direcciones opuestas.
AP: *véase proteína adaptadora.*
apertura angular: semiángulo del cono de luz proveniente de una muestra, que admite la lente objetivo de un microscopio.
apertura numérica (NA): propiedad de un microscopio que se corresponde con el valor n sen α, donde n es el índice de refracción del medio interpuesto entre la muestra y la lente objetivo y α es la apertura angular.
apoptosis: suicidio celular mediado por un grupo de enzimas de degradación de proteínas denominadas caspasas; depende de una serie programada de eventos, que conducen al desmantelamiento del contenido celular.
AQP: *véase acuaporina.*
archaea (arqueobacterias o arqueas): uno de los dos grupos principales de procariotas; muchas arqueobacterias son capaces de crecer en condiciones extremas de salinidad, acidez o temperatura altas, que son limitantes para la mayor parte de organismos.
ARF: *véase factor de ribosilación de adenina.*
arqueobacterias: *véase archaea.*
ascas: pequeños sacos, propios de hongos como *Neurospora*, que contienen a las células producidas durante la meiosis.
asimetría de membrana: propiedad de la membrana que tiene su origen en la diferente composición molecular de las dos monocapas lipídicas, así como de las proteínas asociadas a cada una de ellas.
atenuación: mecanismo de regulación de la expresión génica en bacterias, basado en la terminación prematura de la transcripción.
átomo asimétrico de carbono: átomo de carbono con cuatro sustituyentes distintos. En una molécula orgánica, existen dos estereoisómeros diferentes por cada carbono asimétrico.
átomo de carbono: el átomo más importante en las moléculas biológicas, capaz de formar hasta cuatro enlaces covalentes.
ATP: *véase adenosín trifosfato.*
ATPasa de calcio: proteína de membrana que transporta iones de calcio a través de la membrana, consumiendo energía derivada de la hidrólisis de ATP; un ejemplo destacado es el del retículo sarcoplásmico, donde bombea Ca^{2+} hacia la luz.
ATPasa de Na^+/K^+: *véase bomba de Na^+/K^+.*
ATPasa de tipo F: tipo de ATPasa propia de bacterias, mitocondrias y cloroplastos, que puede emplear la energía de la hidrólisis del ATP para bombear protones en contra de su gradiente electroquímico, así como catalizar el proceso reversible, en el cual el flujo exergónico de protones a favor de gradiente electroquímico, se emplea para sintetizar el ATP. *Véase* también *ATP sintasa.*
ATPasa de tipo V: ATPasa de transporte, que bombea iones hacia el interior de orgánulos, tales como vesículas, vacuolas, lisosomas, endosomas y el complejo de Golgi.
ATPasa tipo ABC: tipo de ATPasa transportadora, caracterizada por tener una región de unión al ATP («**ATP**-**B**inding **C**assette», ABC) El «cassette» es el dominio catalítico y a él se une el ATP durante el proceso de transporte. Se denominan también transportadores ABC. *Véase también transportadores de resistencia a multidrogas.*
ATPasa tipo P: ATPasa de transporte que se fosforila reversiblemente por ATP, como parte del mecanismo de transporte.

ATP sintasa: nombre alternativo para una ATPasa de tipo F cuando cataliza el proceso reverso, en el cual el flujo exergónico de protones a favor de gradiente electroquímico se usa para sintetizar ATP; de este tipo son el complejo CF_0CF_1 de las membranas tilacoideas de los cloroplastos y el complejo F_0F_1 de la membrana mitocondrial interna y de la membrana plasmática de bacterias.
autoensamblaje: principio que establece que los polímeros llevan inherente la información requerida para especificar los plegamientos de macromoléculas y sus interacciones para formar estructuras más complejas, biológicamente activas.
autoensamblaje asistido: plegamiento y ensamblaje de proteínas o estructuras que contienen proteínas, asistido por chaperonas moleculares que aseguran que el proceso se verifique correctamente.
autofagia: digestión intracelular de orgánulos viejos o inservibles u otras estructuras celulares, que tiene lugar dentro de los lisosomas autofágicos.
autofosforilación: fosforilación de un receptor por otro receptor del mismo tipo.
autorradiografía: método para evidenciar la presencia de moléculas radiactivas, cubriendo una muestra con una película fotográfica, que se ennegrece tras la exposición a la radiactividad.
axón: prolongación neuronal que conduce impulsos, centrífugamente, desde el cuerpo celular.
axón gigante de calamar: axón excepcionalmente grande que parte de algunas células nerviosas del calamar; su considerable diámetro (0,5-1,0 mm), facilita la inserción de microelectrodos con los que se pueden medir y controlar potenciales eléctricos y corrientes iónicas.
axonema: grupo de microtúbulos interconectados que forman el esqueleto de cilios y flagelos de células eucariotas. Generalmente se organiza en nueve dobletes de túbulos periféricos alrededor de un par de túbulos centrales.
axoplasma: citoplasma del axón de una célula nerviosa.
ayuste del RNA (*splicing*): escisión de intrones de un transcrito primario de RNA, para generar una molécula de RNA funcional.
ayuste proteico: eliminación de secuencias de aminoácidos de un polipéptido, denominadas inteínas, seguida de empalme de los segmentos remanentes, llamados exteínas.

B

BAC: *véase* cromosoma bacteriano artificial.
bacteria: organismo unicelular, sin núcleo y escasa o nula compartimentación interna *véase también procariota.*
bacterioclorofila: tipo de clorofila propia de bacterias, capaz de extraer electrones de moléculas donadoras diferentes del agua.
bacteriófago (fago): virus que infecta células bacterianas.
bacteriorodopsina: complejo protéico transmembranal que incluye a la rodopsina, capaz de transportar protones a través de la membrana bacteriana, creando un gradiente electroquímico de protones, dependiente de la luz.
balsa lipídica: región particular de la membrana, caracterizada por su alto contenido en colesterol y glicoesfingolípidos; retienen a proteínas implicadas en fenómenos de señalización celular y se denominan también microdominios.
banda A: región de la miofibrilla del músculo estriado, que aparece al microscopio como una banda oscura; contiene los filamentos gruesos de miosina y las regiones de los filamentos de actina que se solapan al filamento grueso.
banda I: región de la miofibrilla del múculo estriado, que aparece como una banda clara cuando se observa en el microscopio electrónico; se corresponde con la región de los filamentos finos de actina que no se superponen a los filamentos gruesos de miosina.
Bcl-2: proteína de la membrana mitocondrial externa que bloquea la muerte apoptótica.
beta oxidación (β-oxidación): ruta constituida por sucesivos ciclos de oxidación, en cada uno de los cuales la cadena de un ácido graso se acorta en dos átomos de carbono, que se liberan como acetil CoA.
biblioteca de cDNA: colección de clones de DNA recombinante, producidos al copiar la población total de mRNAs de un tipo determinado de célula, utilizando la transcriptasa inversa y luego clonando los cDNAs resultantes.
biblioteca genómica: colección de los clones de DNA recombinante, producidos tras cortar en fragmentos el genoma completo de un organismo, empleando para ello enzimas de restricción y clonando después todos los fragmentos con un vector de clonación apropiado.
bicapa lipídica: unidad estructural de membrana, consistente en dos capas de lípidos (principalmente fosfolípidos) dispuestos de manera que las colas hidrófobas se enfrenten entre sí y las regiones polares miren hacia el medio acuoso de cada uno de los lados de la membrana.
bioenergética: área de la ciencia que se ocupa de la aplicación de principios termodinámicos a las reacciones y procesos del mundo biológico.
bioinformática: uso de ordenadores para analizar el elevado número de datos generados en los estudios de secuenciación y expresión en genomas y proteomas.
bioluminiscencia: producción de luz por un organismo, como resultado de la reacción del ATP con determinados compuestos luminiscentes.
bioquímica: estudio de la química de sistemas vivos; sinónimo de química biológica.
biosíntesis: generación de nuevas moléculas en la célula, mediante una serie de reacciones químicas.
BiP: miembro de la familia de las chaperonas Hsp 70, presente en la luz del retículo endoplasmático, donde facilita el plegamiento proteico, mediante uniones reversibles a las regiones hidrófobas de cadenas polipeptídicas.
bivalente: par de cromosomas homólogos que han sinaptado durante la primera división meiótica; contiene cuatro cromátidas, dos por cromosoma.
bomba de Na^+/K^+: transportador de membrana que acopla la hidrólisis de ATP a la entrada de iones potasio y salida de iones sodio, manteniendo el gradiente de ambos iones, característico de la mayoría de las células animales.
bomba de sodio/potasio: *véase bomba de Na^+/K^+.*
bombeo unidireccional de protones: transporte activo unidireccional de protones a través de una membrana, de manera que se acumulen preferentemente en un lado, estableciendo un gradiente electroquímico de protones a ambos lados de la membrana; componente esencial del transporte de electrones y generación de ATP, tanto en la respiración, como en la fotosíntesis.
brazos laterales: estructura compuesta por dineína del axonema, que se proyecta desde cada uno de los túbulos A de los nueve dobletes externos de un cilio o flagelo eucarióticos.
BRE (elemento de reconocimiento de TFIIB): componente del complejo de promoción de la RNA polimerasa II, localizado inmediatamente por encima de la caja TATA.

C

C: *véase citosina.*
C_3, vegetales: plantas que dependen exclusivamente del ciclo de Calvin para la fijación del dióxido de carbono, formando el compuesto de tres átomos de carbono, 3-fosfoglicerato, como producto inicial.
C_4, vegetales: plantas que usan la ruta de Hatch Slack en las células del mesófilo, para la fijación inicial de CO_2, formando oxalacetato (compuesto de cuatro átomos de carbono); el carbono asimilado se libera posteriormente en las células de la vaina vascular, ingresando en el ciclo de Calvin.
cadenas ligeras reguladas: tipo de cadenas ligeras de miosina de células musculares lisas, que son fosforiladas por la quinasa homónima, permitiendo la interacción de filamentos de actina y miosina y, por tanto la contracción muscular.
cadherina: tipo de glicoproteína de la membrana plasmática que media adhesión entre células, dependiente de Ca^{2+}
caja (secuencia) TATA: parte del núcleo de promoción de muchos genes eucarióticos transcritos por la RNA polimerasa II; tiene una secuencia consenso TATA, seguida de dos o tres adeninas más y se localiza unos 25 nucleótidos por encima del punto de inicio de la transcripción.
cal: *véase caloría.*
calmodulina: proteína ligante de calcio implicada en muchos de los efectos intracelulares del calcio en células eucarióticas.
calnexina: proteína de membrana del RE, que forma un complejo con glicoproteínas recién sintetizadas, a las cuales asiste en su correcto plegamiento.
calor: transferencia de energía, como resultado de la diferencia de temperatura.
calor de vaporización: cantidad de energía requerida para convertir 1 g de agua líquida en vapor.
calor específico: cantidad de calor necesaria para elevar 1 g de una sustancia, 1 °C de temperatura.
caloría (cal): unidad de energía; cantidad de energía que se precisa para elevar 1 °C la temperatura de 1 g de agua.
calorimetría de muestreo diferencial: técnica para determinar la temperatura de transición

de una membrana, midiendo la ganancia térmica de la misma, durante la evolución desde el estado de gel al estado fluido.
calrreticulina: proteína soluble del RE, que forma un complejo protéico con glicoproteínas recién sintetizadas, a las cuales asiste en su correcto plegamiento.
CAM: *véase ciclo del metabolismo ácido de crasuláceas.*
cambio conformacional, modelo de: modelo de transporte a través de membrana en el cual una proteína transportadora alterna entre dos estados conformacionales, de forma que su lugar de unión al soluto se abre primero hacia un lado de la membrana y luego hacia el otro.
cambio de energía libre (ΔG): parámetro termodinámico usado para cuantificar la energía liberada o requerida en un proceso o reacción; es una medida de la espontaneidad termodinámica.
cambio de energía libre estándar ($\Delta G^{o\prime}$): cambio de energía libre que acompaña a la conversión de 1 mol de reactivo en 1 mol de productos, a presión, temperatura y concentración de todas las especies relevantes, mantenidas en valores estándar.
cambio de unión, modelo de: mecanismo que implica la rotación de la subunidad γ de una ATP sintasa F_0F_1, propuesto para explicar cómo el flujo exergónico de protones a través del componente F_0, permite la fosforilación endergónica del ADP a ATP, por el componente F_1.
cambios epigenéticos: alteraciones en la expresión de un gen, no debidas a un cambio en la propia estructura de dicho gen.
cAMP: *véase AMP cíclico.*
canal iónico: proteína de membrana que permite el paso de iones; generalmente están regulados por cambios en el potencial de membrana (canales dependientes de voltaje) o por la unión de ligandos específicos (canales dependientes de ligando).
canal iónico dependiente de ligando: proteína integral de membrana, que forma un poro conductor de iones, que se abre cuando una molécula específica (ligando) se une al canal.
canal iónico dependiente de voltaje: proteína integral de membrana que forma un poro conductor, cuya permeabilidad está regulada por cambios en el potencial de membrana.
canal protéico: proteína de membrana que forma un canal hidrófilo,a través del cual pueden pasar solutos, sin que se produzca ningún cambio conformacional en la proteína.
cáncer: masa de células que crece incontroladamente, invadiendo tejidos adyacentes y propagándose a otras partes del cuerpo, a través de los fluidos corporales, especialmente la sangre; sinonimia de tumor maligno.
cañón de electrones: conjunto de componentes que generan el haz de electrones en un microscopio electrónico.
cap (5′) (extremo 5′): estructura metilada del extremo 5′ de los mRNAs de células eucariotas, formada por la adición de 7-metilguanosina y metilación del anillo de ribosa del primer nucleótido y, frecuentemente también el segundo, de dicho extremo 5′.
cara *cis* (cara de formación): lado del complejo de Golgi orientado hacia los elementos de transición del retículo endoplásmico.
cara de formación: *véase cara cis.*
cara de maduración: *véase cara trans.*
cara *trans* (cara de maduración): cara del complejo de Golgi localizada al otro polo de la cara *cis* (de formación).
carboxilo terminal: *véase extremo C-terminal.*
carcinógeno: cualquier agente causal de cáncer.
carcinoma: tumor maligno (cáncer) formado a partir de las células epiteliales que cubren las superficies externas e internas del cuerpo.
cariotipo: fotografía del juego completo de cromosomas de una célula, organizados por pares homólogos y ordenados en base a su tamaño y forma.
carotenoide: uno de los pigmentos accesorios de muchas especies vegetales, que absorben en la región azul del espectro visible (420-480 nm) y son, por tanto, de color amarillo o naranja.
caspasa: cada uno de los elementos de una familia de proteasas que degradan a otras proteínas celulares, como parte del proceso de apoptosis.
caspasa-3: caspasa «ejecutora» clave, que es activada por varias señales intracelulares que conducen a la apoptosis.
catálisis enzimática: participación de una molécula orgánica, generalmente una proteína, pero en algunos casos RNA, en la aceleración de una reacción o tipo de reacciones químicas determinadas. *Véase también catalizador.*
catalizador: agente que aumenta la tasa de reacción, reduciendo la energía de activación y sin que él sea consumido; cambia la velocidad a la cual la reacción se aproxima al equilibrio, pero no la posición del equilibrio.
catecolamina: cualquier compuesto derivado del aminoácido tirosina, que funciona como hormona o neurotransmisor.
CBP: coactivador de la transcripción con actividad histona acetil-transferasa, que se asocia con la RNA polimerasa, facilitando el ensamblaje de la maquinaria de transcripción en el promotor génico.
Cdc 42: miembro de una familia de proteínas G monoméricas, entre las que se encuentran también Rac y Rho, que estimula la formación de estructuras celulares que poseen actina.
Cdk: *véase kinasa dependiente de ciclina.*
cDNA: *véase DNA complementario.*
célula: unidad estructural y funcional básica de todo organismo vivo; la estructura más pequeña capaz de realizar las funciones esenciales que caracterizan a la vida.
célula de la vaina vascular: célula propia de plantas C4, localizada junto al haz vascular de las hojas; en ellas se verifica el ciclo de Calvin.
célula de Schwann: tipo celular del sistema nervioso periférico, que forma la envuelta de mielina alrededor de los axones.
célula glial: célula que rodea, soporta y aísla a las neuronas; en esta categoría, se incluyen las células del microglía, los oligodendrocitos, las células de Schwann y los astrocitos.
célula Hfr: célula bacteriana en la cual el factor F se integra en el cromosoma, permitiendo a la célula transferir DNA genómico, durante la conjugación.
célula madre: célula capaz de dividirse ilimitadamente y de diferenciarse en muchos tipos celulares.
células del mesófilo: células externas de las hojas de las plantas C_4, donde se verifica el ciclo de Hatch-Slack de fijación del carbono.
celulosa: polisacárido estructural presente en la pared de células vegetales, formado por unidades repetitivas de glucosa, unidas por enlaces $\beta(1 \rightarrow 4)$.
centrífuga: aparato que imprime una rotación rápida a un tubo que contiene un fluído, sometiendo a éste a la fuerza centrífuga.
centrifugación: proceso de rotación rápida de un tubo que contiene un fluido, sometiendo a éste a la fuerza centrífuga.
centrifugación diferencial: método para separar orgánulos o moléculas que difieren en tamaño o densidad, sometiendo a las fracciones celulares a una centrifugación a velocidad muy alta, que separa las partículas en función de sus diferentes tasas de sedimentación.
centrifugación en equilibrio de densidad (isopícnica): técnica usada para separar componentes celulares, sometiéndolos a centrifugación en una solución, cuya densidad aumenta desde la parte superior a la inferior del tubo; durante la centrifugación, un orgánulo o molécula en particular, sedimenta hasta alcanzar una posición cuya densidad iguala a la suya propia; en ese punto ya no se desplazará más, puesto que se anulan las fuerzas.
centrifugación en gradiente de densidad (zonal): tipo de centrifugación en la cual la muestra se extiende como una lámina fina en la parte superior de un gradiente de un soluto, deteniéndose el proceso antes de que las partículas alcancen la parte inferior del tubo; separa los orgánulos y las moléculas, fundamentalmente, por su tamaño.
centrifugación zonal: *véase centrifugación en gradiente de densidad.*
centriolo: estructura formada por microtúbulos, integrante del centrosoma de células animales, donde los dos centriolos se disponen en ángulo recto, uno respecto del otro; su estructura es idéntica a la del corpúsculo basal de cilios y flagelos de células eucariotas.
centro activo: lugar de una enzima al cual se une el sustrato, verificándose el proceso catalítico; se denomina también centro catalítico.
centro bimetálico Fe-Cu: complejo formado por un átomo de cobre y el átomo de hierro ligado al grupo hemo de un citocromo captador de oxígeno, como el citocromo a_3; permite la unión de una molécula de O_2 al citocromo hasta que éste acepta cuatro electrones y cuatro protones, liberando dos moléculas de agua.
centro de reacción: elemento de un fotosistema, que contiene las dos moléculas de clorofila que inician la transferencia de electrones, empleando para ello la energía recolectada por otras moléculas de clorofila u otros pigmentos accesorios. *Véase también P680* y *P700.*
centro organizador de microtúbulos (MTOC): estructura que inicia el ensamblado de los microtúbulos; el mejor ejemplo es el del centrosoma.
centrómero: lugar del cromosoma preanafásico, por el cual se unen las cromátidas y al cual se ancla el cinetocoro; contiene DNA repetitivo.
centrosoma: área pequeña adyacente al núcleo de células eucariotas, que contiene un material granular alrededor de los dos centriolos; es el principal organizador microtubular de la célula.
cerebrósido: glicolípido neutro que porta el aminoalcohol esfingosina.
CF: *véase fibrosis quística.*

CF_1: componente del complejo de la ATP sintasa del cloroplasto, que está embebido en la membrana tilacoidea y sirve como traslocador de protones.
CF_o:componente del complejo de la ATP sintasa del cloroplasto, que asoma en la cara estromatica de la membrana del tilacoide y contiene el centro catalítico para la síntesis de ATP.
CFTR: *véase regulador transmembranal de conductancia de fibrosis quística.*
cianobacterias: bacterias clorofílicas que pueden realizar la fotosíntesis; según la teoría endosimbionte, son las precursoras de los cloroplastos .
ciclina: cualquiera de las proteínas que activan a las quinasas dependientes de ciclinas (Cdks), implicadas en la regulación del ciclo celular de eucariotas.
ciclo celular: conjunto de etapas implicadas en la preparación y desarrollo de la división celular; comienza cuando acaban de formarse dos células nuevas por la división de una célula parental y se completa cuando una de esas células entre en división.
ciclo de Calvin: serie de reacciones propias de organismos fotosintéticos, que permiten la fijación y posterior reducción del dióxido de carbono, para formar carbohidratos.
ciclo de Hatch-Slack: serie de reacciones en vegetales C_4, en los cuales el dióxido de carbono se fija en las células del mesófilo, cediéndolo, en forma de compuesto de cuatro carbonos, a las células de la vaina del haz; una vez allí, la posterior descarboxilación aumentará la concentración de dióxido de carbono, con el consecuente incremento en la tasa de fijación de carbono, por la enzima rubisco.
ciclo del ácido tricarboxílico (TCA cycle): ciclo metabólico que oxida el acetil CoA a dióxido de carbono en presencia de oxígeno, generando ATP y los coenzimas reducidos NADH y $FADH_2$; componente de la respiración aerobia; se llama también ciclo de Krebs.
ciclo del glioxilato: versión modificada del TCA, que tiene lugar en los glioxisomas vegetales; es una ruta anabólica que convierte dos moléculas de acetil CoA en una molécula de succinato, permitiendo así la síntesis de hidratos de carbono a partir de lípidos.
ciclo del TCA: *véase ciclo del ácido tricarboxílico.*
ciclosis: *véase corrientes citoplásmicas.*
cilio: apéndice de la superficie de una célula eucariota, rodeado de membrana y formado por microtúbulos dispuestos de forma específica, que permite el desplazamiento de la célula o del medio que la rodea; son más cortos y numerosos que los flagelos. *Véase también flagelo.*
cinética enzimática: análisis cuantitativo de las velocidades de reacciones enzimáticas y cómo son éstas influidas por diversos factores.
cinetocoro : complejo multiproteico de la región del centrómero de un cromosoma, que constituye el lugar de anclaje de los microtúbulos del huso, durante la mitosis o la meiosis.
cisterna: saco aplanado de membrana, como los del retículo endoplásmico o el complejo de Golgi.
cisterna del RE: saco aplanado de retículo endoplásmico.
cisternas mediales: sacos aplanados de membrana del complejo de Golgi, localizados entre los túbulos de la red *cis*-Golgi y la red *trans*-Golgi.
citocalasinas: familia de alcaloides producidos por ciertos hongos, que impiden la polimerización de actina, inhibiendo diferentes movimientos celulares.
citocinesis: división del citoplasma de una célula madre en dos células hijas; generalmente acontece después de la mitosis.
citocromo *c*: hemoproteína del sistema de transporte de electrones, que interviene también en el desencadenamiento de la apoptosis, cuando se libera desde la mitocondria.
citocromo *c* oxidasa: *véase complejo IV.*
citocromos: hemoproteínas del sistema de transporte de electrones, implicadas en la transferencia de electrones desde la coenzima Q al oxígeno, basado en la oxidación y reducción del átomo de hierro central del grupo hemo.
citoesqueleto: red tridimensional interconectada de microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios, que confiere estructura al citoplasma de una célula eucariota e interviene en los movimientos celulares.
citología: estudio de la estructura celular basado, fundamentalmente en técnicas microscópicas.
citoplasma: parte del interior de la célula eucariótica, que no está ocupada por el núcleo; incluye a orgánulos, como la mitocondria, y al citosol.
citosina (C): base nitrogenada designada químicamente como pirimidina, que sirve como unidad de información, cuando está formando parte de una secuencia de bases, en un ácido nucleico; se complementa, por puentes de hidrógeno, con la base guanina (G).
citosol: medio semifluido en el cual están suspendidos los orgánulos del citoplasma.
clatrina: proteína grande que forma una «caja» alrededor de las vesículas y fosas cubiertas, implicadas en la endocitosis y otras formas de transporte intracelular.
claudina: proteína transmembrana que constituye el principal componente estructural de una unión estrecha.
clon: organismo (o célula o molécula) genéticamente idéntico a otro organismo (o célula o molécula), del cual deriva.
clonado del DNA: generación de múltiples copias de una secuencia específica de DNA, bien por replicación, dentro de la célula, de un plásmido recombinante o un bacteriófago, o bien empleando la reacción en cadena de la polimerasa.
clorofila: molécula que absorbe luz y dona los electrones activados a sustancias orgánicas, iniciando las reacciones fotoquímicas que conducen a la generación de NADPH y ATP, requeridos para el ciclo de Calvin; debido a sus propiedades de absorción, la clorofila da a los vegetales su característico color verde.
clorofila, proteínas de unión: culaquiera de las proteínas que estabilizan al conjunto de moléculas de clorofila de un fotosistema.
cloroplasto: orgánulo citoplásmico de células vegetales, rodeado por una membrana doble, que contiene la clorofila y las enzimas necesarias para llevar a cabo la fotosíntesis.
CoA: *véase coenzima A.*
coactivador: proteína que media en las interacciones entre los activadores y los genes a los cuales regulan éstos; se incluye aquí a las enzimas que modifican a las histronas, como las HATs, las proteínas remodeladoras de cromatina, como SWI/SNF y el Mediador.
código de tripletes: sistema de codificación en el cual tres unidades de información son leídas como una unidad; referencia al código genético que es leído por el mRNA en unidades de tres bases llamadas codones.
código degenerado: capacidad del código genético de usar más de un triplete, para especificar un mismo aminoácido.
código genético: conjunto de reglas que especifican la relación entre la secuencia de bases de una molécula de DNA o mRNA y el orden de los aminoácidos en la cadena polípeptídica codificada por ese DNA o mRNA.
codón: triplete de nucleótidos de una molécula de mRNA, que codifica un aminoácido (o una señal de inicio o parada), en la síntesis de proteínas.
codón de iniciación: es el codón AUG del mRNA, que sirve como punto de iniciación para la síntesis de una proteína.
codón de parada (*stop*): secuencia de tres bases del mRNA, que informa al ribosoma que la síntesis de proteínas debe terminar. Los tripletes UAG, UAA y UGA suelen ser los codones de terminación.
coeficiente de sedimentación: medida de la tasa de movimiento de una partícula o macromolécula, impulsada por un campo de fuerza centrífuga; se expresa en unidades Svedberg.
coenzima: molécula orgánica pequeña que funciona en conjunción con una enzima, transportando electrones o grupos funcionales.
coenzima A (CoA): molécula orgánica que transporta grupos acilo, formando enlaces tioéster de alta energía, con ácidos orgánicos.
coenzima Q (CoQ): componente no proteico (quinona) del sistema mitocondrial de transporte de electrones, que sirve de punto de recolección de los electrones que provienen de las deshidrogenasas asociadas a FMN o a FAD: recibe también el nombre de ubiquinona.
cohesina: proteína que mantiene unidas a las cromátidas hermanas, antes de la anafase.
cola poli(A): cadena de unos 50-250 nucleótidos de adenina, que se añaden al extremo 3′ de la mayoría de los mRNAs eucarióticos, después de completarse la transcripción.
colágeno: familia de proteínas que forman fibras muy resistentes y abundantes en las matrices extracelulares de los animales.
colchicina: alcaloide de origen vegetal, que se une a la tubulina, impidiendo su polimerización en microtúbulos.
colesterol: constituyente lipídico de la membrana plasmática; es, además, precursor de hormonas esteroídicas.
complejo Arp2/3: complejo de proteínas asociadas a actina, que permite polimerizar a los monómeros de actina formando ramificaciones laterales sobre microfilamentos preexistentes.
complejo $CFoCF_1$: complejo de la ATP sintasa presente en la membrana tilacoidea del cloroplasto; cataliza el proceso por el cual el flujo exergónico de protones a favor de

gradiente electroquímico, se emplea para sintetizar ATP .

complejo citocromo b_6/f: complejo multiprotéico de la membrana del tilacoide, que transfiere electrones desde una plastoquinona hasta una plastocianina, durante las reacciones de transferencia de electrones de la fotosíntesis.

complejo de Golgi: pila de cisternas aplanadas y de forma discoidal, propia de las células eucariotas, que interviene en los procesos de empaquetamiento de las proteínas de secreción y en la síntesis de polisacáridos complejos.

complejo de iniciación (30S): complejo formado por la reunión del mRNA, la subunidad 30S del ribosoma, una molécula iniciadora de aminoacil-tRNA y el factor de iniciación IF2.

complejo de iniciación (70S): complejo formado por la asociación de un complejo de iniciación 30S y la subunidad 50S del ribosoma; tiene un aminoacil-tRNA en el *locus* P y está listo para iniciar la traducción.

complejo de pre-replicación: grupo de proteínas que se unen al DNA eucariótico y le autorizan a replicarse; incluye al Complejo de Reconocimiento del Origen, el complejo MCM y los cargadores de helicasas.

complejo de promoción de anafase: gran complejo multiprotéico que conduce a proteínas seleccionadas (ej. securina y ciclina mitótica) a su degradación, iniciando así la anafase y completándose la mitosis.

complejo del fotosistema: conjunto formado por un fotosistema junto con los complejos de captura de luz que lleva asociados**.**

complejo F_o: grupo de proteínas hidrófobas de membrana que anclan al complejo F_1 a la membrana mitocondrial interna o a la membrana plasmática bacteriana; sirve como canal translocador de protones, a través del cual pasan los protones, cuando se emplea el gradiente electroquímico de membrana para dirigir la síntesis de ATP.

complejo F_1: esfera pedunculada que se proyecta desde la membrana mitocondrial interna (o hacia el citosol, desde la membrana plasmática, en el caso de las bacterias), que contiene los elementos para la síntesis del ATP, acoplada a respiración aerobia.

complejo F_oF_1: complejo proteico de la membrana mitocondrial interna y de la membrana plasmática bacteriana, formado por el complejo F_1, unido al complejo F_o; el flujo de protones a través del componente F_o, permite la síntesis de ATP en el componente F_1.

complejo I (oxidorreductasa NADH-coenzima Q): complejo multiproteico de la cadena transportadora de electrones, que cataliza la transferencia de electrones desde el NADH a la coenzima Q.

complejo II (oxidorreductasa succinato-coenzima Q): complejo multiproteico de la cadena transportadora de electrones, que cataliza la transferencia de electrones desde el succinato a la coenzima Q.

complejo III (oxidorreductasa coenzima Q-citocromo *c*): complejo multiproteico de la cadena transportadora de electrones, que cataliza la transferencia de electrones desde la coenzima Q al citocromo c .

complejo IV (citocromo *c* oxidasa): complejo multiproteico de la cadena transportadora de electrones, que cataliza la transferencia de electrones desde el citocromo *c* al oxígeno.

complejo mayor de histocompatibilidad (MHC): proteína de la superficie celular, reconocida por el sistema inmunológico durante la respuesta inmune.

complejo multiproteico: dos o más proteínas (generalmente enzimas) unidas de manera que cada proteína realiza su función de forma secuencial, dentro de un mismo proceso.

complejo productor de oxígeno (OEC): complejo formado por iones manganeso y por proteínas, que forma parte del fotosistema II, que cataliza la oxidación del agua a oxígeno.

complejo recolector de luz (LHC): colección de pigmentos que absorben luz, generalmente clorofilas y carotenoides unidos a proteínas; a diferencia de un fotosistema, no tienen un centro de reacción, si bien absorben los fotones de la luz, canalizando la energía hacia un fotosistema próximo.

complejo recolector de luz I (LHCI): complejo recolector asociado al fotosistema I.

complejo recolector de luz II (LHCII): complejo recolector asociado al fotosistema II.

complejo respiratorio: elemento del sistema transportador de electrones, formado por diferentes polipéptidos y sus grupos prostéticos, que en conjunto verifican el proceso de transporte electrónico.

complejo sinaptonémico: estructura proteica en forma de cremallera, que une los cromosomas homólogos durante la profase I de la meiosis

complejos del poro nuclear (NPC): estructuras proteicas formadas por 100 o más subunidades polípeptídicas diferentes, que limitan a los poros, a través de los cuales entran y salen las moléculas del núcleo, bien por difusión simple (moléculas pequeñas), bien por transporte activo (moléculas grandes).

complementariedad de bases: relación de complementariedad entre purinas y pirimidinas, basadas en puentes de hidrógeno, que permiten el reconocimiento y unión de ácidos nucléicos; A se complementa con T o U y G con C.

complementariedad: en los ácidos nucleicos, la capacidad de la guanina (G) de formar puentes de hidrógeno con la citosina (C) y de la adenina (A) con la timina (T) o el uracilo (U).

comunicación intercelular: intercambio de componentes celulares entre células adyacentes, por conexiones directas, establecidas por las uniones comunicantes (*gap junctions*) de células animales y los plasmodesmos de células vegetales.

concentración crítica: concentración de tubulina a la cual, la velocidad de polimerización está en equilibrio con la de despolimerización.

conexón: complejo formado por el ensamblaje de seis subunidades proteicas, que dejan un orificio central, que sirve de canal en la membrana de una unión comunicante (*gap*).

conformación: forma tridimensional de un polipéptido u otra macromolécula biológica.

conformación nativa: plegamiento tridimensional de una cadena polípeptídica, en una forma que representa el estado más estable de esa secuencia particular de aminoácidos.

conjugación: acoplamiento celular durante el cual se transfiere DNA de una bacteria a otra.

cono de emergencia del axón: región en la base del axón en la que está facilitada la generación del potencial de acción.

constante de disociación (K_d):concentración de ligando libre, necesario para alcanzar un estado en el cual, la mitad de los receptores permanecen unidos a dicho ligando

constante de equilibrio (K_{eq}): relación entre las concentraciones de los productos y los reactivos en una reacción química, cuando ésta ha alcanzado el equilibrio.

constante de Michaelis (K_m): concentración de sustrato a la cual una reacción catalizada enzimáticamente procede a la mitad de su velocidad máxima.

constricción telofásica: proceso de división del citoplasma de células animales, en virtud del cual, una banda de microfilamentos de actina, situada justo debajo de la membrana plasmática, se contrae, estrangulando a la célula y finalmente dividiéndola en dos.

contorno: el resto del universo cuando se estudia la distribución de la energía en un sistema dado.

contracción muscular: generación de tensión en las células musculares por deslizamiento de los filamentos finos (actina) sobre los filamentos gruesos (miosina).

contractildad: acortamiento de las células musculares.

control de calidad del DNA: eliminación de pares de bases incorporados erróneamente durante la replicación del DNA, gracias a la actividad exonucleasa de la DNA polimerasa.

control de la respiración: regulación de la fosforilación oxidativa y del transporte de electrones, mediante la disponibilidad de ADP.

control de la traducción: mecanismo que regula la velocidad a la cual las moléculas de mRNA se traducen en productos polípeptídicos; depende de las tasas de control por factores de iniciación, por represores que inhiben selectivamente a ciertos mRNAs y de las diferentes tasas de degradación del mRNA.

control de la transcripción: conjunto de mecanismos de regulación implicados en el control de las tasas a las cuales son transcritos determinados genes.

control génico: regulación de la expresión o la organización estructural del genoma.

control negativo: control genético en el cual el elemento clave de regulación, inhibe la transcripción génica.

control positivo: control en el que el elemento regulador actúa activando la transcripción génica.

control postraducción (postranslacional): mecanismo de regulación génica, que implica la modificación selectiva de polipéptidos ya sintetizados; incluye a las modificaciones covalentes, los cortes proteolíticos, el plegamiento y ensamblaje de proteínas, la importación por orgánulos y la degradación proteica.

conversión génica: fenómeno por lo cual los genes sufren una recombinación no génica durante la meiosis, de forma que uno de los genes de recombinados termina en los dos cromosomas de un par homólogo, en lugar de ser intercambiado de un cromosoma al otro.

cooperatividad: propiedad de las enzimas con muchos centros catalíticos, consistente en que la unión de una molécula de sustrato a uno de los lugares de catálisis, produce un cambio conformacional que influye en la afinidad del sustrato por los lugares remanentes.

CoQ: *véase coenzima Q.*
co-represor: molécula efectora, que junto con el represor, impide la transcripción de un operón bacteriano.
corpúsculo basal: estructura microtubular de apariencia idéntica a la de los centriolos, localizada en la base de cilios y flagelos de células eucariotas y consistente en nueve conjuntos de tripletes de túbulos.
corpúsculo polar: pequeña célula haploide producida durante las divisiones meióticas que conducen a la formación del huevo. Los corpúsculos polares reciben una cantidad ínfima de citoplasma y finalmente degeneran.
corriente: movimiento de iones, positivos o negativos.
corrientes citoplásmicas: movimiento del citoplasma basado en la interacción entre filamentos de acina y determinados tipos de miosinas; en las células vegetales se denomina ciclosis.
córtex: *véase córtex celular.*
córtex celular: red compacta de microfilamentos de actina y proteínas asociadas, localizada justo por debajo de la membrana plasmática de la mayoría de células animales; se ancla a la membrana y da consistencia a la superficie celular, facilitando los cambios de forma y movimientos celulares.
CREB: factor de transcripción que activa a genes inducibles por AMP cíclico, uniéndose a los elementos de respuesta del DNA.
crecimiento dependiente de anclaje: requerimiento de unión a una superficie sólida, como la matriz extracelular, de las células que van a crecer y dividirse.
crecimiento independiente de anclaje: propiedad exhibida por células cancerosas que pueden crecer, no sólo unidas al sustrato, sino también cuando se encuentran en suspensión en un medio líquido o semisólido.
cremallera de leucina: motivo de unión al DNA característico de muchos factores de transcripción; se forma por la interacción entre hélices de dos cadenas polípeptídicas, que se unen en forma de cremallera, gracias a interacciones hidrófobas entre residuos de leucina.
cresta : repliegue de la membrana mitocondrial interna hacia la matriz, que aumenta el área de dicha membrana; contiene las enzimas del transporte de electrones y de la fosforilación oxidativa.
criofijación: congelación rápida de muestras pequeñas, de manera que las estructuras celulares se puedan inmovilizar en milisegundos; suele preceder a la criosustitución, en la cual un disolvente orgánico reemplaza al agua de la muestra.
criofractura: técnica de preparación de microscopia electrónica, empleada para la observación del interior de una membrana; la cual la muestra es congelada y fracturada con una cuchilla, con el fin de ver la superficie de fractura.
criograbado: ruptura violenta de una muestra congelada rápidamente, seguida de la sublimación del hielo, con el fin de resaltar pequeñas áreas de la superficie de la célula.
criograbado profundo: modificación de la clínica del criograbado, en la que se realiza una congelación ultra rápida, con un medio crioprotector volátil, con el fin de prolongar el período de grabado; de esta manera, se consigue eliminar más hielo de la superficie, lo cual facilita la observación en profundidad.
criomicroscopia electrónica: técnica en la cual el material criofijado, se observa directamente, a baja temperatura, en el microscopio electrónico; suele emplearse para la observación de suspensiones o macromoléculas aisladas.
cristalografía de rayos-X: *véase difracción de rayos-X* .
cromátidas hermanas: las dos copias replicadas de cada cromosoma, que permanecen unidas una a otra hasta la anafase de la mitosis.
cromatina: fibras de DNA y proteínas que forman los cromosomas; están constituídas por los nucleosomas, que se distribuyen a espacios regulares a lo largo de una cadena de DNA.
cromatografía: conjunto de técnicas que se basan en el desplazamiento de una fase fluída sobre un soporte absorbente estático, para separar moléculas en base a sus afinidades relativas por las dos fases, es decir, por su tamaño, carga, hidrofobicidad o afinidad por un grupo químico en particular.
cromatografía de capa fina (TLC): método de separación de compuestos por cromatografía, en un medio, por ejemplo ácido silícico, que se extiende en una capa fina sobre una superficie de vidrio o de metal.
cromosoma: en eucariotas, es una molécula única de DNA, unida a histonas y otras proteínas, que se condensa durante la mitosis y la meiosis, formando una estructura compacta. *Véase también cromosoma bacteriano.*
cromosoma artificial de levaduras (YAC): vector de clonación de levaduras consistente en un cromosoma «minimalista», que contiene las secuencias de DNA necesarias para su replicación y segregación a las células hijas, pero muy poco más.
cromosoma bacteriano: molécula de DNA circular y proteínas asociadas, que contiene el genoma principal de una célula bacteriana.
cromosoma bacteriano artificial (BAC): vector de clonación bacteriano derivado del plásmido «factor F», que facilita la clonación de fragmentos largos de DNA.
cromosoma politénico: cromosoma gigante que contiene múltiples copias de la misma molécula de DNA, generado por sucesivas rondas de replicación, sin que se produzca la división celular.
cromosoma sexual: cromosoma implicado en la determinación del si el individuo es macho o hembra.
cromosomas homólogos: las dos copias de un cromosoma específico, cada una de un parental, que pueden intercambiar información genética durante la meiosis.
C-terminal (carboxilo terminal): extremo de una cadena polipéptidica, que contiene el último aminoácido en ser incorporado durante la traducción del mRNA; generalmente retiene un grupo carboxilo libre.
cuerpo celular: parte de una célula nerviosa que contiene el núcleo y otros orgánulos; de él parten prolongaciones, llamadas axón y dendritas.
cuerpo residual: lisosoma maduro que ha completado la digestión, quedando sólo los residuos no digeribles.
chaperona molecular: proteína que facilita el plegamiento de otras proteínas, sin formar parte de la estructura final.
chromatin fibra de cromatina de 30-nm: fibra formada por el empaquetamiento de los nucleosomas de la fibra de cromatina de 10-nm.

D

DAG: *véase diacilglicerol.*
dedos de zinc: motivo de unión al DNA, propio de algunos factores de transcripción; formado por una hélice α y dos segmentos en lámina β, que se mantienen en su lugar por interacción de residuos de cisteína o histidina con un átomo de zinc.
defosforilación: eliminación de un grupo fosfato.
degrón: secuencia de aminoácidos de una proteína, que se usará como etiqueta para su destrucción.
dendrita: prolongación de una célula nerviosa, que recibe impulsos y los transmite hacia el cuerpo celular.
desarrollo (de un organismo): serie de divisiones mitóticas y especialización progresiva de varios grupos de células, que conduce a la formación de un embrión multicelular y, finalmente, a un organismo adulto.
desecador de punto crítico: receptáculo empleado para deshidratar por completo una muestra, bajo condiciones controladas de presión y temperatura
deshidrogenación: eliminación de electrones y iones de hidrógeno (protones) en una molécula orgánica; oxidación.
desmosoma: unión de adhesión célula a célula, conectada con el citoesqueleto por filamentos intermedios; crea puntos de adherencia intensa entre células animales adyacentes, confiriendo integridad estructural y aumentando la resistencia a la tensión
desnaturalización: pérdida de la conformación tridimensional de una macromolecula, con la correspondiente pérdida de su actividad biológica; originada por agentes tales como el calor, pH extremo, altas concentraciones de urea o sal y otros reactivos químicos. *Véase también desnaturalización del DNA.*
desnaturalización del DNA: separación de las dos cadenas de una doble hélice de DNA, causada por la interrupción en la complementariedad de bases
desoxirribosa: azúcar de cinco carbonos presente en el DNA.
despolarización: cambio en el potencial de membrana, hacia un valor menos negativo.
diacilglycerol (DAG): glicerol esterificado con dos ácidos grasos, que se forma, junto al inositol trifosfato (IP_3), tras la hidrólisis del fosfatidilinositol-4-5-bifosfato, por la fosfolipasa C; permanece unido a la membrana después de la hidrólisis, y puede actuar como un segundo mensajero, activando a la proteína quinasa C que, a su vez, fosforila a determinados residuos de serina y treonina, de una gran variedad de proteínas.
diacinesis: última etapa de la profase I de la meiosis; caracterizada por la condensación de los cromosomas, desaparición de los nucleolos, ruptura de la envuelta nuclear e inicio de la formación del huso acromático.
dicer: enzima que rompe los RNAs de doble cadena, en fragmentos cortos de unos 23 pares de bases.

diferenciación: *véase diferenciación celular.*
diferenciación celular: proceso por el cual las células adquieren las propiedades que permiten distinguirlas de otros tipos celulares.
difracción: imagen de la interferencia aditiva o sustractiva, que exhiben las ondas luminosas.
difracción de rayos-X: técnica para determinar la estructura tridimensional de macromoléculas, basada en el patrón producido cuando un haz de rayos-X atraviesa una muestra, generalmente un cristal o una fibra; se llama también «cristalografía de rayos-X».
difusión: movimiento libre de un soluto, en la dirección dictada por las diferencias de concentración entre dos regiones diferentes.
difusión facilitada: movimiento de una sustancia a través de una membrana, facilitado por una proteína transportadora; no requiere energía, pues el ion o la molécula a transportar, se desplaza a favor de gradiente electroquímico
difusión lateral: difusión de un lípido o proteína en el plano de la membrana.
difusión simple: movimiento neto, no asistido de un soluto, desde la región de mayor a la de menor concentración.
difusión transversa: movimiento de una molécula lipídica de una monocapa a la otra de una membrana; es termodinámicamente poco favorable y, por tanto, un hecho infrecuente; se denomina también «flip-flop.»
digestión extracelular: degradación de componentes fuera de la célula, generalmente debida a enzimas lisosomales, que se liberan por exocitosis
dinactina: complejo proteico que facilita la unión entre la dineína de los microtúbulos y la vesícula de transporte.
dinamina: GTPasa del citosol necesaria para el estrangulamiento y separación de una vesícula de clatrina en gemación.)
dineína: proteína motora que se desplaza por los microtúbulos desde el extremo *más* hacia el *menos*, hidrolizando ATP; está presente, tanto en el citoplasma, como en los brazos adyacentes de los dobletes del axonema de un cilio o un flagelo.
dineína citoplásmica: proteína motora citoplásmica, que se desplaza por la superficie de los microtúbulos, desde el extremo *menos* al *más*, consumiendo ATP; se asocia con la dinactina, que la une a las vesículas de transporte.
dineína del axonema: proteína motora del axonema de cilios y flagelos, que genera movimiento a base de desplazarse por la superficie de los microtúbulos, con consumo de ATP.
dinucleótido de flavina y adenina (FAD): coenzima capaz de aceptar dos electrones y dos protones de una molécula orgánica oxidada, para generar la forma reducida, $FADH_2$; interviene como transportador de electrones en el metabolismo energético.
dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD$^+$): coenzima que acepta dos electrones y un protón, para generar la forma reducida NADH; transportador del electrones que interviene en el metabolismo energético.
dinucleótido de nicotinamida y adenina fosforilado (NADP$^+$): coenzima que acepta dos electrones y un protón, para generar la forma reducida NADPH; transportador del electrones que interviene en el ciclo de Calvin y otras rutas biosintéticas.
diploide: que contiene dos juegos de cromosomas y, por tanto, dos copias de cada gen; hace referencia a una célula, a un núcleo o al organismo formado por tales células.
diplotene: etapa de la profase I de la meiosis, caracterizada porque los cromosomas homólogos de cada bivalente, empiezan a separarse uno del otro, resolviendo los quiasmas que los unen.
direccionalidad: condición de poseer dos extremos que difieren, químicamente, uno del otro; describe polímeros, como una proteína, un ácido nucleico o un hidrato de carbono; también se emplea para describir los sistemas de transporte a través de membrana, que mueven los solutos en una dirección determinada.
disacárido: hidrato de carbono formado por unidades de monosacáridos unidos covalentemente.
discos intercalares: región de la membrana rica en uniones comunicantes (*gap junctions*), que se establece entre dos células musculares cardíacas contiguas.
disolvente: sustancia, generalmente líquida, en la que se pueden disolver otras sustancias, formando una disolución.
división celular: proceso por el cual una célula da lugar a otras dos.
DNA (ácido desoxirribonucleico): macromolecula depositaria de la información genética; está formado por nucleótidos, a su vez formados, por desoxirribosas fosfato unidas a adenina, timina, citosina o guanina; forma una doble hélice mantenida por la complementariedad de bases entre adenina y timina y entre citosina y guanina.
DNA complementario (cDNA): molécula de DNA copiada de un molde de mRNA, por la enzima transcriptasa inversa.
DNA girasa: tipo de topoisomerasa II que puede deshacer una superhélice positiva e inducir un superenrollamiento negativo en el DNA; interviene en la desespiralización de la doble hélice, durante la replicación del DNA.
DNA helicasa: una de las muchas enzimas que desenrollan la doble hélice del DNA, empleando al ATP como fuente de energía.
DNA ligasa: enzima que une dos fragmentos de DNA, catalizando la formación de un enlace fosfodiéster entre los extremos de los dos fragmentos.
DNA no repetitivo: secuencias del DNA del genoma de un organismo, que están presentes en copias únicas
DNA polimerasa: uno de los grupos enzimáticos implicados en la replicación y reparación del DNA, que cataliza la adición de nucleótidos al extremo 3′ de una cadena de DNA en crecimiento, usando como molde a otra cadena preexistente.
DNA repetido en tándem: secuencias de DNA repetitivo cuyas múltiples copias están unas a continuación de las otras.
DNA repetitivo intercalado: secuencias repetitivas de DNA, cuyas múltiples copias aparecen dispersas por todo el genoma.
DNA repetitivo: secuencias de DNA presentes en múltiples copias en el genoma de un organismo.
DNA superenrollado: giro de una doble hélice de DNA sobre sí misma, dando lugar a una molécula de DNA circular o a un lazo que se ancla por sus extremos.
DNasa I, lugar de hipersensibilidad: lugar próximo a un gen activo, que muestra una extremada sensibilidad a la digestión por la nucleasa DNAsa I; se piensa que se corresponde con los lugares de unión de los factores de transcripción y otras proteínas reguladoras.
doble hélice (modelo): las dos hebras enrolladas de una molécula de DNA, que se mantienen unidas por fenómenos de complementariedad de bases entre adenina (A) y timina (T) y entre citosina (C) y guanina (G).
dobletes externos: pares de microtúbulos fusionados, dispuestos en grupo de nueve, en la periferia del axonema de los cilios y flagelos de células eucariotas.
dominante (alelo): alelo que determina cómo se manifestará un carácter en un organismo, en función de que se presente en las formas homocigota o heterocigota.
dominio: región discreta dentro de la estructura terciaria de una proteína que, a menudo, contiene hélices α y láminas β, empaquetadas de forma compacta.
dominio de activación: región de un factor de transcripción, distinta del dominio de unión al ligando y responsable de activar la transcripción.
dominio de regulación de la transcripción: región de un factor de transcripción, diferente del dominio de unión al DNA, que es responsable de regular la transcripción.
dominio SH2: región de una molécula proteica que reconoce y se une a tirosinas fosforiladas de otra proteína.
dominios en forma de lazo: repliegues de la fibra de cromatina de 30-nm, que forman lazos de 50.000-100.000 bp de longitud, gracias a la unión periódica de una red insoluble de proteínas no histónicas.
***downstream*:** localizado hacia el extremo 3′ de la hebra codificante del DNA; *este término, cuya traducción literal es «aguas abajo», suele traducirse en el texto como «hacia la derecha» o «por debajo de».*
DPE: *véase elemento promotor downstream.*
Drosha: enzima nuclear que corta el tránscrito primario de los genes *microRNA* (pri-microRNAs), para formar los los precursores de los microRNAs (pre-microRNAs).

E

***E*:** *véase energía interna.*
E_A: *véase potencial estandard de reducción.*
E'_0: *véase energía de activación.*
E2F, factor de transcripción: factor proteico que, cuando no está unido a la proteína Rb, activa la transcripción de genes que codifican a proteínas, que se requieren para la replicación del DNA y la entrada en la fase S del ciclo celular.
E, cara: cara interna de la monocapa externa de una membrana, cuando se observa con la técnica de criofractura; se denomina E por estar en el lado *externo* de la membrana.
E, sitio (sitio de salida): lugar del ribosoma al que se desplaza el tRNA vacío, durante la translocación que antecede a su liberación
EBV: *véase virus de Epstein-Barr.*
ECM: *véase matriz extracelular.*
ecuación de Eadie-Hofstee: ecuación alternativa a la de Lineweaver-Burk, para el análisis gráfico de la cinética enzimática, enfrentando $v/[S]$ y v.

ecuación de Goldman: modificación de la ecuación de Nernst para el cálculo del potencial de reposo de membrana, considerando para ello el efecto conjunto de todos los genes relevantes y teniendo en cuenta su permeabilidad relativa.
ecuación de Lineweaver-Burk: ecuación lineal obtenida invirtiendo la ecuación de Michaelis-Menten; es válida para la determinación de los parámetros V_{max} y K_m y para el análisis de la inhibición enzimática.
ecuación de Michaelis-Menten: ecuación que describe la relación entre la velocidad y la concentración de sustrato de una reacción catalizada enzimáticamente: $V = V_{max}[S]/(K_m + [S])$.
ecuación de Nernst: ecuación para el cálculo del potencial equilibrio de membrana, para un determinado ion: $E_x = (RT/zF) \ln[X]_{outside}/[X]_{inside}$.
edición del RNA: alteración en la secuencia de bases de una molécula de mRNA, por la inserción, eliminación o modificación de nucleótidos.
efecto amplificador de Emerson: cuando se ilumina con luz roja de dos longitudes de onda ligeramente diferentes, se observa un incremento en la actividad fotosintética, equivalente a la suma de las actividades obtenidas por separado.
efector: *véase efector alostérico.*
EGF: *véase factor de crecimiento epidérmico.*
elastina: subunidad proteica de las fibras elásticas de la matriz extracelular.
electroforesis: grupo de técnicas que utilizan un campo eléctrico para separar moléculas cargadas eléctricamente.
electroforesis en gel: técnica de separación de proteínas o ácidos nucleicos, en geles de poliacrilamida o agarosa, a los que se aplica un campo eléctrico.
electronegatividad: propiedad de los átomos que tienden a perder electrones.
elemento de respuesta a choque térmico: secuencia de bases del DNA localizada junto a los genes de choque térmico, que sirve como lugar de unión de los factores de transcripción de choque térmico.
elemento de respuesta a hierro (IRE): secuencia corta de bases, propia de mRNAs cuya traducción o estabilidad está controlada por hierro; lugar de unión de las proteínas de unión a IRE.
elemento de respuesta a hormonas: secuencia de bases del DNA a la que se une, selectivamente, un complejo hormona-receptor, que activa (o inhibe) la transcripción de genes próximos.
elemento de respuesta: secuencia de bases del DNA, que se encuentra físicamente separada de los genes cuya expresión se regula, por la unión, a dicha secuencia, de un factor de transcripción regulador.
elemento de transición (TE): región del retículo endoplásmico implicada en la formación de las vesículas de transición.
elemento en *cis*: secuencia del DNA a la que se puede unir una proteína reguladora.
elemento promotor *downstream* (DPE): uno de los elementos del núcleo de promoción (secuencias de DNA) de la RNA polimerasa II, que se localiza unos 30 nucleótidos por debajo del punto inicial de transcripción.
elementos proximales de control: secuencias reguladoras de DNA localizadas por delante del centro de promoción, pero no más allá de unos 100-200 pares de bases.
elongación (de microtúbulos): crecimiento de microtúbulos por adición de heterodímeros de tubulina, en cualquiera de los extremos.
endergónico: relativo a una reacción que requiere energía, caracterizada por un cambio positivo en la energía libre ($\Delta G > 0$).
endocitosis: entrada de materiales extracelulares, gracias a la invaginación y posterior estrangulamiento de vesículas de membrana que contienen los elementos extracelulares.
endocitosis de fase fluida: toma inespecífica de fluidos extracelulares por invaginación de la membrana, seguida de la formación de una vesícula.
endocitosis dependiente de clatrina: *véase endocitosis mediada por receptores.*
endocitosis mediada por receptores (dependiente de clatrina): tipo de endocitosis que comienza con la formación de una fosa cubierta, que evoluciona hacia una vesícula, igualmente cubierta; se supone que es el principal mecanismo de toma selectiva de macromoléculas y péptidos hormonales.
endosoma: *véase endosomas tempranos* o *endosomas tardíos.*
endosoma tardío: vesícula que contiene hidrolasas ácidas recién sintetizadas junto con el material destinado a la digestión; las hidrolasas se activan por descenso del pH en el endosoma, o cuando son transferidas a un lisosoma preexistente.
endosoma temprano: vesículas formadas en la red *trans*-Golgi, que sirven para la clasificación y reciclado del material extracelular tomado por endocitosis.
energía: capacidad de producir trabajo; posibilidad de causar cambios específicos.
energía contra gradiente de concentración: energía necesaria para transportar iones o moléculas a través de una membrana, contra un gradiente electroquímico o de concentración.
energía contra gradiente eléctrico: energía necesaria para transportar iones a través de una membrana, en contra de su gradiente eléctrico.
energía de activación (E_A): energía requerida para iniciar una reacción química.
energía de enlace: cantidad de energía requerida para romper un mol de un determinado enlace químico.
energía interna (E): energía total almacenada por un sistema: como tal, no se puede medir directamente, pero sí los cambios de energía interna.
energía libre (G): función termodinámica que mide la energía utilizable de una molécula; en condiciones de temperatura y presión constantes, el cambio de energía libre es una forma de medir la capacidad de trabajo del sistema.
enfermedad lisosomal de acumulación: alteración que resulta de la deficiencia de una o más enzimas lisosomales, caracterizada por la acumulación patológica de determinadas sustancias, que normalmente se degradarían por las enzimas mencionadas.
enlace covalente: enlace químico fuerte en el que dos átomos comparten dos o más electrones.
enlace doble: enlace químico formado entre dos átomos que comparten dos pares de electrones.
enlace fosfoanhídrido: enlace de alta energía entre grupos fosfato.
enlace fosfodiéster: enlace covalente en el que dos partes de una molécula están unidas, por átomos de oxígeno, a un mismo grupo fosfato.
enlace fosfoéster: enlace covalente en el que una molécula se une a un grupo fosfato, mediante un átomo de oxígeno.
enlace glicosídico: enlace que une un azúcar con otra molécula, que puede ser también un azúcar.
enlace iónico: fuerza de atracción entre un grupo químico cargado positivamente y otro cargado negativamente.
enlace peptídico: enlace covalente entre el grupo amino de un aminoácido y el grupo carboxilo de un segundo aminoácido.
enlace sencillo: enlace químico formado entre dos átomos, resultante de compartir un par de electrones.
enlace triple: enlace químico entre dos átomos que comparten tres pares de electrones.
ensamblaje jerárquico: síntesis de estructuras biológicas, casi siempre por mecanismos de autoensamblaje, empezando con moléculas simples que progresan en complejidad.
entalpía (*H*): cantidad de calor que contiene una sustancia, expresada como la suma de su energía interna, *E*, más el producto de la presión por el volumen: $H = E + PV$.
entrecruzamiento *Holliday junction*: estructura en forma de X, que aparece durante la recombinación genética, cuando dos moléculas de DNA se juntan por el entrecruzamiento de una sola hebra.
entropía (*S*): medida de la aleatoriedad o desorden de un sistema.
envuelta de mielina: capas concéntricas de membrana que rodean a un axón, actuando como un aislante eléctrico que facilita la transmisión de los impulsos nerviosos.
envuelta nuclear: membrana doble que rodea el núcleo, salpicada de múltiples interrupciones, que son los poros nucleares.
enzima de restricción: miembro de una gran familia de enzimas aisladas de bacterias, que cortan las moléculas de DNAs exógenos, en o cerca de secuencias de reconocimiento palindrómicas, generalmente con una longitud de cuatro a seis pares de bases (pero que pueden ser ocho o más); se usan en técnicas de DNA recombinante, para cortar moléculas de DNA en lugares específicos.
enzima inducible: enzima cuya síntesis depende de la presencia de su sustrato.
enzima: catalizador biológico; proteína (o en ciertos casos, RNA), que actúa sobre uno o más sustratos, convirtiéndolos en productos, con diferentes estructuras moleculares. *Véase también ribozima.*
EPSP: *véase potencial postsináptico excitador.*
equilibrio electroquímico: situación en la que el gradiente de concentración a través de membrana para un ion especifico, está en equilibrio con el potencial eléctrico de esa misma membrana, de manera que no hay flujo neto del ion.
esfera de hidratación: roseta de moléculas de agua alrededor de un ion, debida a la interacción de éste con la región del dipolo de agua cargada opuestamente; permite la disociación en el agua de pares iónicos.

esfingolípido: tipo de lípido cuyo esqueleto es el amino alcohol esfingosina.
esfingosina: amino alcohol común a todos los esfingolípidos; contiene un grupo amino, que puede formar un enlace amida con ácidos grasos de cadena larga y un grupo hidroxilo, que puede unir un grupo fosfato.
espacio intermebrana: región de la mitocondria o el cloroplasto, entre las membranas externa e interna.
espacio perinuclear: espacio entre las membranas nucleares interna y externa, que se continúa con la luz del retículo endoplásmico.
especificidad de grupo: capacidad de una enzima para actuar sobre un grupo completo de sustancias, siempre y cuando éstas posean alguna característica estructural común.
especificidad de sustrato: capacidad de una enzima para discriminar entre varias moléculas similares.
espectro de absorción: rango de longitudes de onda de luz que es capaz de absorber un pigmento.
espermatozoide: gameto haploide masculino, generalmente flagelado.
espinas radiales: proyecciones desde los nueve dobletes periféficos hacia el par de microtúbulos centrales del axonema de cilios y flagelos eucarióticos; se cree que asisten a que el axonema se doble, cuando se produce el deslizamiento entre los dobletes.
espontaneidad termodinámica: estimación de la posibilidad de que ocurra una reacción, pero que no indica que ésta tenga realmente lugar. Las reacciones con intercambio de energía libre negativa, son hemodinámicamente espontáneas
espora: *véase espora haploide.*
espora haploide: producto haploide de la meiosis, en organismos que muestran alternancia de generaciones; cuando germina, da lugar a la forma haploide del organismo (el gametofito, en el caso de los vegetales superiores).
esporofito: generación diploide en el ciclo de vida de un organismo, que alterna entre las formas haploide y diploide; forma que produce esporas por meiosis.
estabilización de resonancia: situación de mayor estabilidad en la configuración de una molécula, en la que el par de electrones no compartido alcanza su máxima deslocalización.
estado: condición de un sistema, definida por varias propiedades, como temperatura, presión y volumen.
estado de transición: etapa intermedia de una reacción química, de energía libre mayor que la del estado inicial, a través de la cual deben pasar los reactivos antes de dar lugar a los productos.
estado estacionario: condición fuera del equilibrio en un sistema abierto en el que fluye la materia, de manera que todos los componentes del sistema están presentes a concentraciones constantes de no equilibrio.
estado estándar: conjunto de convenciones arbitrarias, descritas por conveniencia, para describir los cambios de energía de las reacciones químicas. En los sistemas formados por disoluciones acuosas, dichas condiciones suelen ser de de 25 °C (298 °K) de temperatura, 1 atmósfera de presión y una concentración de reactivos, diferentes del agua, de 1 *M.*
estado metaestable: condición en la que los reactivos potenciales son termodinámicamente inestables, pero carecen de la energía suficiente para superar la barrera de activación para esa reacción.
e**stereoisómeros:** dos moléculas con la misma fórmula estructural, pero no superponibles; los estereoisómeros son imagen especular uno del otro.
estereo-microscopia electrónica: técnica que permite la observación tridimensional, a partir de pares fotográficos tomados con ángulos ligeramente diferentes.
esteroide: una de las muchas moléculas lipídicas derivadas del compuesto tetracíclico fenantreno.
esterol: compuesto formado por un anillo tetracíclico de 17 carbonos con, al menos, un grupo hidroxilo y diferentes grupos laterales; incluye al colesterol y otras moléculas relacionadas, con significación biológica, como las hormonas sexuales masculina y femenina.
estoma: poro en la superficie foliar de un vegetal, que se puede abrir y cerrar, para controlar el el intercambio de gases y agua entre la atmósfera y el interior de la hoja.
estroma: matriz desestructurada semifluída que ocupa el interior del cloroplasto.
estructura cuaternaria: nivel estructural proteico que implica interacciones entre dos o más cadenas polípeptídicas, para formar una proteína multimérica.
estructura primaria: secuencia de aminoácidos en una cadena polípeptídica.
estructura secundaria: nivel de organización estructural de las proteínas, que afecta a los puentes de hidrógeno establecidos entre los átomos implicados en los enlaces peptídicos del eje del polipéptido; existen dos patrones principales de estructura secundaria, denominados hélice α y lámina β.
estructura terciaria: nivel estructural proteico, que implica interacciones entre las cadenas laterales de los aminoácidos de un polipéptido, con independencia de su posición en la secuencia primaria; es responsable de los plegamientos tridimensionales de una cadena polípeptídica.
eubacteria: miembro de uno de los dos principales grupos de porcariotas (el otro es el de las arqueobacterias); incluye a la mayoría de las bacterias y cianobacterias actuales.
eucromatina: cromatina descondensada y laxa, típica de la interfase; contiene el DNA transcripcionalmente activo. *Véase también heterocromatina.*
eukaryota: organismo cuyas células se caracterizan por la presencia de un núcleo verdadero, rodeado de membrana, y otros orgánulos también con membrana propia.
evaporador al vacío: campana que contiene un electrodo de metal y otro de carbono, en la cual se practica el vacío; se emplea en la preparación de réplicas metálicas de la superficie de las muestras biológicas.
excitabilidad eléctrica: capacidad de respuesta frente a ciertos tipos de estímulos, manifestada por una serie rápida de cambios en el potencial de membrana, conocidos como potencial de acción.
exergónico: relativo a las reacciones de liberación de energía; caracterizado por un cambio negativo de energía libre ($\Delta G < 0$).
exocitosis: fusión de la membrana de una vesícula con la nueva plasmática, de forma que el contenido de la vesícula se vierte o segrega hacia el medio extracelular.
exón: secuencia de nucleótidos de un tránscrito primario, que se conservará en la molécula de RNA madura y funcional. *Véase también intrón.*
exonucleasa: enzima que degrada ácidos nucleicos (generalmente DNA), actuando desde los extremos.
exportina: proteína receptora nuclear que se une a las señales de exportación nuclear de proteínas diana, transportandolas a través del complejo del poro, desde el núcleo hasta el citosol
extensina: grupo de glicoproteínas que forman moléculas rígidas, con forma de bastón, que se entrecruzan en las paredes celulares de plantas y hongos.
extremo cohesivo: extremo de un fragmento de DNA monocatenario generado por escisión por una enzima de restricción, que tiende a reasociarse, por complementariedad de bases, con otro fragmento generado por la misma enzima de restricción.
extremo *más* (del microtúbulo): extremo de crecimiento rápido de un microtúbulo.
extremo *menos* (de los microtúbulos): extremo de crecimiento lento (o de no crecimiento, o de acortamiento) de un microtúbulo.

F

F2,6BP: *véase fructosa-2,6-bifosfato.*
factor de crecimiento: proteína de señalización que estimula la división celular de células diana específicas; como ejemplos están el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF).
factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF): proteína producida por las plaquetas sanguíneas, que estimula la proliferación de los tejidos conjuntivo y muscular liso.
factor de crecimiento epidérmico (EGF): proteína que estimula el crecimiento y división de una amplia variedad de tipos de células epiteliales.
factor de crecimiento fibroblástico (FGF): una de las muchas proteínas de señalización, que estimulan el crecimiento y división de los fibroblastos y otras muchas células, tanto en la vida adulta, como durante el desarrollo embrionario.
factor de crecimiento transformante β (TGFβ): familia de factores de crecimiento, que pueden exhibir propiedades, tanto de estimulación, como de inhibición del crecimiento, dependiendo del tipo de célula sobre la que actúen; regulan un amplio rango de actividades en embriones y animales adultos, incluyendo el crecimiento, la división, la diferenciación y la muerte celulares:
factor de ribosilación de adenina (ARF): proteína asociada a los coatómeros COPI de las vesículas cubiertas tipo COPI.
factor de supervivencia: molécula segregada cuya presencia evita que una célula entre en apoptosis.
factor de transcripción: proteína imprescindible para la unión de la RNA polimerasa a un promotor y para que se inicie la transcripción de manera óptima. *Véase* también *factor de transcripción general* y *factor de transcripción regulador*.
factor de transcripción general: proteína imprescindible para que la RNA polimerasa se

una a su promotor e inicie la síntesis del RNA, con independencia de cuál sea el gen.

factor de transcripción regulador: proteína que se une a los elementos de regulación situados fuera del núcleo de promoción, controlando así la tasa de transcripción de uno o más genes determinados.

Factor F: Secuencia del DNA que permite a una célula de E. coli, actuar como donante de DNA, durante la conjugación bacteriana.

factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF): proteína que estimula la liberación del GDP unido a la proteína Ras, permitiendo que ésta adquiera una molécula de GTP.

factor rho (ρ): proteína bacteriana que se une al extremo 3′ de las moléculas de RNA recién formadas, desencadenando el final de la transcripción.

factor sensible a N-etilmaleimida (NSF): proteína citoplásmica soluble, que funciona en conjunción con varias proteínas de anclaje a NSF, para permitir la fusión de membranas que se mantienen muy próximas, gracias a las interacciones entre v-SNAREs y t-SNAREs.

factor sigma (σ): subunidad de la RNA polimerasa bacteriana, responsable de que la síntesis del RNA se inicie en el sitio correcto de la hebra del DNA.

factor transactivador: proteína de regulación que ejerce su función uniéndose a secuencias específicas del DNA.

factores de elongación: grupo de proteínas que catalizan las etapas de la fase de elongación de la síntesis de proteínas; por ejemplo, los factores EF-Tu y EF-Ts.

factores de iniciación: proteínas que promueven la unión de las subunidades del ribosoma al mRNA y al tRNA de iniciación, empezando así la traducción.

factores de separación: proteínas que finalizan la traducción, estimulando la separación entre el polipéptido completo y el peptidil tRNA del sitio P del ribosoma.

FAD: *véase dinucleótido de flavina y adenina.*

fago: *véase bacteriófago.*

fagocito: leucocitos que llevan a cabo la fagocitosis, como mecanismo de defensa.

fagocitosis: tipo de endocitosis en la cual se incorporan, en vesículas de digestión, las partículas grandes e incluso células completas tomadas del medio.

familia de receptores de proteínas G: receptores de la membrana plasmática, que tras la unión del ligando apropiado, activan a una determinada proteína G.

fase G1: etapa del ciclo celular eucariótico, comprendida entre el final de una división previa y el inicio de la síntesis del DNA cromosómico.

fase G2: etapa del ciclo celular eucariótico, comprendida entre el final de la replicación del DNA cromosómico y el inicio de la división celular.

fase M: etapa del ciclo celular eucariota, durante la cual el núcleo y el resto de la célula se dividen.

fase S: etapa del ciclo celular eucariota, durante la cual se sintetiza el DNA.

Fd: *véase ferredoxina.*

fecundación: unión de los gametos haploides para formar una célula diploide, el zigoto, que da lugar a un nuevo organismo.

fenotipo: características físicas de un organismo, atribuibles a la expresión de su fenotipo.

fenotipo salvaje (*wild type*): forma normal, no mutante de un organismo, usualmente la forma encontrada en la naturaleza.

fermentación: oxidación parcial de carbohidratos en una ruta independiente de oxígeno (anaeróbica), produciendo, casi siempre, etanol y dióxido de carbono o lactato.

fermentación alcohólica: catabolismo anaeróbico de carbohidratos, con etanol y dióxido de carbono como productos finales.

fermentación láctica: catabolismo anaeróbico de hidratos de carbono, con producción de lactato.

ferredoxina (Fd): proteína ferro-sulfurosa del estroma del cloroplasto, implicada en la transferencia de electrones desde el fotosistema I, durante las reacciones de transducción energética de la fotosíntesis.

ferredoxina-NADP$^+$reductase (FNR): enzima localizada en la cara estromática de la membrana del tilacoide, que cataliza la transferencia de electrones desde la ferredoxina al NADP$^+$.

FGF: *véase factor de crecimiento fibroblástico.*

FGFR: *véase receptor del factor de crecimiento fibroblástico.*

FH: *véase hypercolesterolemia familiar.*

FI: *véase filamentos intermedios.*

fibra de colágeno: fibras de la matriz extracelular, de extraordinaria resistencia y varios micrómetros de diámetro; se forma a partir de varias fibrillas de colágeno, que a su vez son el resultado de la agregación ordenada de moléculas de colágeno

fibra de cromatina (30 nm): fibra que resulta del empaquetamiento compacto de los nucleosomas de la fibra de cromatina de 10 nm.

fibra muscular: célula multinucleada, larga y delgada, especializada en la contracción.

fibronectina: glicoproteina adhesiva de la matriz extracelular, que se asocia débilmente con la superficie de las células; ancla a éstas a la matriz e interviene en la determinación de la forma celular y en los procesos de migración celular.

fibrosis cística: patología cuyos síntomas derivan de la incapacidad de segregar iones cloruro; está causada por un defecto genético en una proteína de membrana, que actúa como un canal iónico.

ficobilina: pigmento accesorio propio de las algas rojas y las cianobacterias, que absorbe luz visible en el rango verde-naranja del espectro, dando a esas células sus colores característicos.

ficobilisoma: complejo captador de luz, propio de las algas rojas y las cianobacterias, que contiene ficobilinas en lugar de clorofila y carotenoides.

fijador: reactivo químico que mata a las células, a la vez que preserva su apariencia estructural, para la observación microscópica.

filamento fino: filamento que contiene actina, propio de las miofibrillas de las células musculares esqueléticas, en las que un par de filamentos de actina F se enrollan en una hélice, junto con tropomiosina y troponina.

filamento grueso: filamento que contiene miosina, propio de las miofibrillas de las células musculares esqueléticas, en las que las moléculas individuales de miosina se disponen formando un haz escalonado, con las cabezas proyectando hacia el exterior, siguiendo un patrón repetitivo.

filamentos intermedios (FI): proteínas filamentosas, que constituyen el componente más estable del citoesqueleto de las células eucariotas; tienen un diámetro entre 8 y 12 nm, que es intermedio entre el de los microfilamentos de actina y los microtúbulos.

filopodio: expansión fina y afilada del citoplasma de las células eucariotas, que emerge transitoriamente durante el movimiento celular.

fitosterol: uno de los múltiples esteroles que pueden aparecer en las membranas de las células vegetales; como ejemplos están el campesterol, el sitosterol y el estigmasterol.

flagelo: expansión que contribuye a la motilidad de las células eucariotas, rodeada de membrana y compuesta por un haz de microtúbulos dispuestos de manera específica; más largos y menos numerosos (en general sólo uno o unos pocos por célula) que los cilios.

flavoproteína: proteína que lleva estrechamente unida una coenzima de flavina (FAD o FMN) y que sirve como donador o aceptor biológico de electrones.

flipasa: *véase translocador de fosfolípidos.*

flujo cíclico de electrones: transferencia de electrones impulsada por la luz, desde el fotositema I hacia una serie de trasportadores de electrones que los conducen de retorno a una molécula de clorofila del mismo fotosistema; la energía liberada en el proceso se emplea para sintetizar ATP.

flujo no cíclico de electrones: flujo continuo y unidireccional de electrones desde el agua al NADP$^+$, durante las reacciones de transducción de energía propias de la fotosíntesis, en las que la luz provee de la energía necesaria para dicho flujo.

flujo retrógrado (de actina F): movimiento en masa de microfilamentos de actina hacia la parte posterior de una protrusión celular (por ejemplo un lamelipodio), conforme se extiende ésta.

fluorescencia: propiedad de las moléculas de absorber luz de una determinada longitud de onda y emitir energía en forma de luz de longitud de onda más larga.

fluorescencia de transferencia de energía de resonancia (FRET): interacción entre dos moléculas fluorescentes muy próximas, en la cual la excitación se transfiere directamente desde una molécula donadora a otra receptora; se usa para determinar que ambas moléculas están en contacto, o bien para producir «biosensores» que detectan la activación de proteínas, o cambios en la concentración local de iones.

FNR: *véase ferredoxina-NADP$^+$ reductasa.*

fosfodiesterasa: enzima que cataliza la hidrólisis del AMP cíclico a AMP.

fosfofructoquinasa-2 (PFK-2): enzima que cataliza la fosforilación, dependiente de ATP, del átomo de carbono 2 de la fructosa-6-fosfato, para formar fructosa-2, 6-bifosfato (F2,6BP); es un regulador esencial de la glicolisis y la gluconeogénesis.

fosfoglicérido: fosfolípido predominante de la membrana celular, formado por una molécula de glicerol esterificada por dos ácidos grasos y un grupo fosfato.

fosfoglicolato: compuesto de dos carbonos producido por la actividad oxigenasa de la enzima rubisco. Como no puede ser

metabolizado en la siguiente etapa del ciclo de Calvin, la producción de fosfoglicolato disminuye la eficacia fotosintética.

fosfolipasa C: enzima que cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bifosfato en inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG).

fosfolípido: lípido que lleva un grupo fosfato unido covalentemente, por lo que tiene propiedades, tanto hidrófilas, como hidrófobas; principal componente de la bicapa lipídica, que constituye la base de toda membrana celular.

fosforilación: adición de un grupo fosfato.

fosforilación en el nivel de sustrato: formación de ATP por transferencia directa al ADP de un grupo fosfato de alta energía, derivado de un sustrato fosforilado.

fosforilación oxidativa: formación de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico, acoplando la fosforilación del ADP con la oxidación exergónica por el oxígeno, de moléculas de coenzimas reducidos; el gradiente de protones interviene como intermediario del proceso.

fotoactivación: activación por la luz de una molécula inerte; generalmente asociada con la capacidad que tiene la luz ultravioleta, para «desenjaular» a una molécula fluorescente, es decir, eliminar un grupo químico que enmascara la emisión de la luz fluorescente.

fotoautótrofo: organismo capaz de obtener energía del sol y emplearla para sintetizar moléculas orgánicas de alta energía, partiendo del dióxido de carbono.

fotoblanqueado: técnica en la que se usa un haz muy potente de luz para que los fluoróforos pierdan la capacidad de emitir luz fluorescente; la velocidad a la cual las áreas blanqueadas son colonizadas por fluoróforos que no han sido fotoblanqueados, da información sobre la dinámica del movimiento de estos últimos.

fotoexcitación: excitación de un electrón a un nivel energético superior, tras la absorción de un fotón de luz.

fotofosforilación: generación de ATP dependiente de la luz y dirigida por un gradiente electroquímico de protones, que se establece y mantiene cuando los electrones excitados de la clorofila, vuelven a su nivel energético basal, vía el sistema transportador de electrones.

fotoheterótrofo: organismo capaz de obtener energía del sol, pero cuya fuente de carbono son compuestos orgánicos y no el dióxido de carbono.

fotón: partícula fundamental de la luz cuya energía es inversamente proporcional a su longitud de onda.

fotoreducción: generación de NADPH transfiriendo electrones energéticos desde las moléculas de clorofila fotoexcitada al $NADP^+$, a través de una serie de transportadores de electrones.

fotorespiración: ruta dependiente de la luz que disminuye la eficacia de la fotosíntesis, reduciendo compuestos de carbono, sin capturar la energía liberada; tiene lugar cuando el oxígeno sustituye al dióxido de carbono en la reacción catalizada por la enzima rubisco, que genera fosfoglicolato, que es luego convertido en 3-fosfoglicerato en los peroxisomas y las mitocondrias; se conoce también como ruta del glicolato.

fotosíntesis: proceso por el cual los vegetales (fotosintéticos) y ciertas bacterias convierten la energía de la luz en energía química, que es usada luego para sintetizar moléculas orgánicas.

fotosistema I (PSI): fotosistema que contiene un par de moléculas de clorofila (P700), que absorben principalmente luz roja de 700-nm; la luz de esta longitud de onda excita a los electrones derivados de la plastocianina, hasta un nivel energético que les permite reducir a la ferredoxina, desde la cual los electrones reducirán el $NADP^+$ a NADPH.

fotosistema II (PSII): fotosistema que contiene un par de moléculas de clorofila (P680), que absorben principalmente luz roja de 680-nm; la luz de esta longitud de onda excita a los electrones cedidos por el agua hasta un nivel energético que les permite reducir a la plastoquinona.

fotosistema: conjunto de moléculas de clorofila, pigmentos accesorios y proteínas asociadas que aparece en las membranas tilacoideas o en las membranas fotosintéticas bacterianas; interviene en la fase lumínica de la fotosíntesis.

fotótrofo: organismo capaz de utilizar la energía radiante del sol para satisfacer sus requerimientos energéticos.

fotótrofo anoxigénico: organismo fotosintético, que durante la transducción de electrones en la fotosíntesis, utiliza como donador de electrones a sustratos oxidables diferentes del agua.

fotótrofo oxigénico: organismo que utiliza el agua como donador de electrones, liberando oxígeno, durante la fotosíntesis.

fraccionamiento subcelular: técnica para el aislamiento de orgánulos, a partir de un homogenado celular, usando diferentes tipos de centrifugación

fragmentos de Okazaki: fragmentos cortos recién sintetizados de la cadena retrasada del DNA, que son empalmados por la DNA ligasa; se producen durante la replicación del DNA.

fragmoplasto: haz paralelo de microtúbulos que guía a las vesículas que contienen los polisacáridos y las glicoproteínas hacia el ecuador del huso acromático, para la formación de la pared celular, durante la división de las células vegetales.

FRET: *véase fluorescencia de transferencia de energía de resonancia.*

frotis Pap: técnica microscópica para la detección del cáncer de cuello de útero, a partir de un frotis vaginal.

fructosa-2,6-bifosfato (F2,6BP): molécula de fructosa doblemente fosforilada, que se forma por la acción de la fosfofructoquinasa-2 sobre la fructosa-6-fosfato; juega un papel esencial en la regulación de la glucolisis y la gluconeogénesis.

fuerza protón-motriz (pmf): fuerza transmembrana ejercida por el gradiente electroquímico de protones, que tiende a desplazarlos de vuelta, a favor del gradiente de concentración.

G

G: *véase guanina* o *energía libre.*

ΔG: *véase cambio de energía libre.*

$\Delta G^{0\prime}$: *véase cambio de energía libre estándar.*

G0 (cero): término aplicado a las células eucariotas que quedan detenidas en la fase G1 del ciclo celular y, por tanto, no proliferan.

GAG: *véase glicosaminoglicanos.*

gametofita: generación haploide en la vida de un organismo, que alterna entre las formas haploide y diploide; es la forma que produce los gametos.

gametogénesis: proceso de producción de gametos.

gametos: células haploides producidas por cada uno de los parentales, que se fusionan para formar una descendencia diploide.

gangliósido: glicolípido cargado que contiene el amino-alcohol esfingosina y residuos de ácido siálico, de carga negativa.

GAP: *véase proteínas activadoras de GTPasas.*

Gb: gigabases; mil millones de pares de bases.

GEF: *véase factor intercambiador de nucleótidos de guanina.*

gelificación-solificación: alternancia entre un estado gelatinoso, espeso y otro más fluido del citoplasma.

gen: «factor hereditario» que especifica la herencia de un carácter; está formado por una secuencia de bases de DNA, que codifica la secuencia de aminoácidos de una o más cadenas polípeptídicas o, alternativamente, uno o más tipos de RNA, que realizan funciones diferentes de la codificación de cadenas polípeptídicas (por ejemplo, rRNA, tRNA, snRNA, or microRNA).

gen APC: gen supresor de tumores, frecuentemente mutado en cánceres de colon, que codifica una proteína implicada en la ruta de Wnt.

gen centinela: gen supresor de tumores, directamente implicado en la detención de la proliferación celular; las mutaciones de pérdida en función de tales genes, pueden derivar en un exceso de proliferación celular y formación de tumores.

gen constitutivo: gen constantemente activo, es decir, que no precisa de regulación.

gen custodio («caretaker»): gen supresor de tumores involucrado en la reparación del DNA o en la correcta segregación de cromosomas; las mutaciones de pérdida de función en tales genes contribuyen a la inestabilidad genética.

gen regulado: gen cuya actividad no es continua, sino que se controla de acuerdo a las necesidades de la célula.

gen supresor de tumores: gen cuya inactivación o pérdida por mutación, puede favorecer el desarrollo de un cáncer. *Véase* también *genes centinela* y *genes custodios.*

generación F_1: descendencia de la generación P_1 en un experimento de genética.

generación F_2: descendencia de la generación F_1 en un experimento de genética.

generación P_1: primera generación parental en un experimento de herencia genética.

genes de choque térmico: genes cuya transcripción se activa cuando las células son expuestas a temperaturas elevadas, o a otras condiciones estresantes. Algunos de estos genes codifican chaperonas, que además de asistir al plegamiento de proteínas, pueden intervenir en la renaturalización de proteínas dañadas por el calor.

genes homeóticos: familia de genes que controlan el plan de formación del cuerpo durante el desarrollo embrionario; codifican factores de transcripción que poseen homeodominios.

genes ligados, grupo de: grupo de genes que se transmiten, heredan y segregan juntos.

genes ligados: genes que generalmente se heredan juntos, porque están localizados muy próximos unos de otros en el mismo cromosoma.
genética: estudio del comportamiento de los genes, que son las unidades químicas en las que reside la capacidad de almacenamiento y transmisión de la información hereditaria.
genoma: el DNA (o en algunos virus, el RNA) que contiene una copia completa de toda la información génica de un organismo o virus.
genotipo: expresión génica de un organismo.
girasa: *véase DNA girasa.*
glicerol: alcohol de tres carbonos, con un grupo hidroxilo en cada uno de ellos; es el elemento central de los triacilgliceroles.
glicolípido: molécula lipídica que lleva unido un grupo carbohidrato
glicoproteína: proteína con uno o más grupos azucarados, unidos covalentemente a cadenas laterales de aminoácidos.
glicosaminoglicano (GAG): polisacárido formado por la repetición de un disecárido compuesto por un azúcar con un grupo amino y otro azúcar con carga negativa, generalmente debida a un grupo sulfato o un carboxilo; es un componente de la matriz extracelular.
glicosilación: adición de cadenas azucaradas en determinados residuos aminoacílicos de las proteínas; generalmente comienza en la luz del retículo endoplásmico y se completa en el aparato de Golgi.
glicosilación en N: adición de unidades de oligosacárido en los grupos amino laterales de residuos de asparagina de una proteína.
glicosilación en O: adición de oligosacáridos a los grupos hidroxilo de residuos de serina o treonina de las proteínas.
glicosilación terminal: modificación de glicoproteínas en el complejo de Golgi, mediante la eliminación o adición de azúcares en las cadenas hidrocarbonadas laterales, previamente incorporadas en el retículo endoplásmico.
glioxisoma: tipo de peroxisoma vegetal, que contiene algunas de las enzimas responsables de la conversión en hidratos de carbono, de las grasas almacenadas por las semillas en germinación.
glucógeno: polisacárido de reserva de las células animales, altamente ramificado y formado por unidades repetitivas de glucosa, unidas entre sí por enlaces $\alpha(1 \rightarrow 4)$ y $\alpha(1 \rightarrow 6)$.
glucolisis (ruta glucolítica): serie de reacciones en las cuales la glucosa u otro monosacárido se cataboliza a piruvato, sin participación del oxígeno y generando dos moléculas de ATP por cada molécula de monosacárido metabolizado
gluconeogénesis: síntesis de glucosa a partir de precursores, tales como los aminoácidos, el glicerol o el lactato; tiene lugar en el hígado, en una ruta que es esencialmente la inversa de la glucolisis.
glucosa: azúcar de seis átomos de carbono, ampliamente usada como molécula inicial en el metabolismo energético celular.
GluT: *véase transportador de glucosa.*
glycocálix: región rica en hidratos de carbono, localizada en el borde externo de la mayoría de las células animales.
gradación de tumores: asignación numérica basada en la apariencia microscópica de un tumor; los cánceres de mayor grado, tienden a crecer y expandirse más agresivamente y a responder peor a la terapia, que los de grado bajo.
gradiente de concentración: gradiente transmembrana en la concentración de una molécula o un ion, expresado como la relación entre la concentración de la sustancia a un lado y al otro de la membrana; es la única fuerza que impulsa a las moléculas a atravesar una membrana, pero tan sólo una de los dos componentes del potencial electroquímico, que permiten que un ion la atraviese.
gradiente electroquímico de protones: gradiente transmembrana de protones, con un componente eléctrico, debido a la separación de cargas y un componente químico, debido a la diferencia en la concentración de protones (pH) a ambos lados de la membrana
gradiente electroquímico: *véase potencial electroquímico.*
gráfica doble recíproca: método gráfico para el análisis de los datos de la cinética enzimática, enfrentando a $1/v$ con $1/[S]$.
gráfico hidropático (o de hidrofobicidad): gráfico que muestra la localización de un grupo de aminoácidos hidrófobos dentro de la estructura primaria de una molécula proteica; se emplea para determinar la localización presuntiva de los segmentos transmembrana de las proteínas integrales.
gránulo de secreción: vesícula de secreción muy densa y de gran tamaño.
granum (plural, **grana**): pila de las membranas del tilacoide de un cloroplasto.
grupo de proteínas de alta movilidad (HMG): grupo de proteínas no histónicas asociadas a la cromatina de células eucariotas, que presentan una elevada movilidad electroforética; se piensa que son proteínas que regulan la expresión génica.
grupo funcional: grupo de elementos químicos unidos covalentemente unos a otros, que confiere unas propiedades químicas características a la molécula a la que está unido de forma covalente.
grupo prostético: ion o molécula orgánica pequeña, componente de una enzima, que desempeña un papel indispensable en la actividad catalítica de la misma.
GTPasa de Rab: proteína que hidroliza GTP, implicada en la unión entre v-SNAREs y t-SNAREs, durante el transporte de vesículas hacia la membrana de destino apropiada.
guanina (G): base nitrogenada designada químicamente como purina, que sirve como unidad de información, cuando está formando parte de una secuencia de bases de un ácido nucleico; se complementa, por puentes de hidrógeno, con la base citosina (C).

H

H: *véase entalpía.*
haploide: que contiene un único juego de cromosomas y, por tanto, una copia sencilla del genoma.
HAT: *véase acetil transferasa de histonas.*
HDL: *véase lipoproteína de alta densidad.*
hebra codificante: hebra del DNA dicatenario que resulta del apareamiento con la hebra molde; su secuencia es idéntica a la de la cadena de RNA transcrita por la hebra molde, con la salvedad de que el RNA tiene uracilo (U), donde la cadena codificante tiene timina (T).
hebra conductora: hebra del DNA que crece como una cadena continua en dirección $5' \rightarrow 3'$, durante la replicación del DNA. *Véase también hebra retrasada.*
hebra molde: hebra de un DNA de doble cadena, que sirve como molde para la síntesis del RNA, mediante el apareamiento de bases complementarias.
hebra retrasada: hebra del DNA que crece en dirección $3' \rightarrow 5'$ durante la replicación del DNA; se sintetiza en forma de fragmentos cortos con dirección $5' \rightarrow 3'$, que son posteriormente empalmados. *Véase también hebra conductora.*
hebra retrasada: hebra del DNA que crece en dirección $3' \rightarrow 5'$ durante la replicación del DNA; se sintetiza en forma de fragmentos cortos con dirección $5' \rightarrow 3'$, que son posteriormente empalmados. *Véase también hebra conductora.*
helicasa: *véase DNA helicasa.*
hélice: *véase hélice alfa o doble hélice.*
hélice alfa : estructura secundaria de proteínas, de forma helicoidal, consistente en un esqueleto peptídico con los grupos R de los aminoácidos expuestos hacia el exterior.
hélice-lazo-hélice: motivo de unión al DNA encontrado en factores de transcripción, que se caracteriza por presentar una hélice corta y otra más larga, conectadas mediante un lazo.
hélice-vuelta-hélice: motivo de interacción con el DNA encontrado en muchos factores de transcripción, caracterizado por tener dos regiones helicoidales separadas por una zona acodada.
hemicelulosas: grupo heterogéneo de polisacáridos que se depositan, junto a la celulosa, en las paredes vegetales de plantas y hongos, confiriéndoles mayor resistencia; cada una está formada por una cadena larga y lineal de un solo tipo de azúcar, con escasas ramificaciones.
hemidesmosoma: punto de anclaje de las células epiteliales con la lámina basal, donde se acumulan las integrinas, que se relacionan con los filamentos intermedios del citoesqueleto, a través de proteínas enlazadoras.
hendidura (o brecha) sináptica: separación entre las membranas presináptica y postsináptica en la unión entre dos células nerviosas.
heterocigoto: que tiene dos alelos diferentes para un gen dado. *Véase también homocigoto.*
heterocromatina: cromatina altamente compacta propia de la interfase; contiene DNA que no está siendo transcrito. *Véase también eucromatina.*
heterocromatina constitutiva: regiones del cromosoma que están prácticamente siempre condensadas, en todas las células de un organismo y que, por tanto, pueden considerarse inactivas desde el punto de vista genético. *Véase también heterocromatina facultativa.*
heterocromatina facultativa: regiones del cromosoma particularmente condensadas e inactivas, en un tipo particular de célula, en un momento determinado. *Véase también heterocromatina constitutiva.*
heterodímero alfa beta : dímero compuesto por una molécula de tubulina α y otra de tubulina β y que constituye la unidad estructural de los microtúbulos.

heterodímero $\alpha\beta$**:** *véase heterodímero alfa beta.*
hialuronato: glicosaminoglicano presente en altas concentraciones en las matrices extracelulares en las que haya una alta proliferación y emigración, así como en las de las articulaciones móviles.
hibridación: *véase hibridación de ácidos nucleicos.*
hibridación de ácidos nucleicos: grupo de técnicas en las cuales se persigue que un ácido nucleico interaccione con otro, por complementariedad de bases; se usa para comprobar si dos ácidos nucleicos tienen secuencias similares.
híbrido de resonancia: estructura real de ciertos grupos funcionales, como el carboxílico o el fosfato, que se representan como dos o más estructuras con los átomos de oxígeno unidos por un doble enlace y uno o más enlaces sencillos, cuando el par de electrones no compartidos están en realidad deslocalizados; el híbrido de resonancia se representa uniendo todos los oxígenos con enlaces simples y punteados, indicando la deslocalización de un par de electrones.
hidrato de carbono: nombre genérico aplicado a moléculas que contienen carbono, hidrógeno y oxígeno en la proporción $C_n(H_2O)_n$; como ejemplos están el almidón, la glucosa y la celulosa.
hidrocarburo: molécula orgánica formada exclusivamente por átomos de carbono e hidrógeno; no suelen ser compatibles con las células vivas.
hidrófilo: moléculas o regiones de moléculas que pueden asociarse con el agua o disolverse en ella, pues tienen preponderancia de grupos polares.
hidrófobo: moléculas o regiones de moléculas poco solubles en agua, debido a que predominan en ellas los grupos no polares.
hidrogenación: adición de electrones y iones de hidrógeno (protones) a una molécula orgánica; reducción.
hidroxilación: reacción química en la cual se añade un grupo hidroxilo a una molécula orgánica.
hipercolesterolemia familiar: predisposición genética a tener niveles altos de colesterol en sangre y padecimiento cardíaco, cuya causa es un defecto hereditario en el gen que codifica el receptor de LDL.
hiperpolarización: situación en la cual el potencial de membrana es más negativo de lo habitual.
hipótesis de la flexibilidad: flexibilidad en el apareamiento de bases entre la tercera base de un codón y la correspondiente base en su anticodón.
hipótesis: formulación o explicación en consonancia con la mayoría de las observaciones y las evidencias experimentales, obtenidas hasta la fecha.
histona: tipo de proteína básica encontrada en los cromosomas eucarióticos; el octámero de histonas, forma la pieza central del nucleosoma.
homeobox **(caja homeótica):** secuencia del DNA muy conservada, característica de los genes homeóticos; codifica un dominio proteico de unión al DNA, presente en los factores de transcripción que regulan la expresión génica durante el desarrollo.
homeodominio: secuencia de unos 60 aminoácidos, encontrada en los factores de transcripción codificados por los genes homeóticos; tienen un motivo hélice-vuelta-hélice.
homocigoto: que tiene dos alelos idénticos para un gen dado.
homogeneización: ruptura de células o tejidos por aplastamiento, vibración ultrasónica o choque osmótico.
homogeneizado: suspensión de orgánulos, pequeños componentes celulares y moléculas, producidos tras el fraccionamiento celular, mediante técnicas tales como el aplastamiento, la vibración ultrasónica o el choque osmótico.
hopanoide: miembro de la familia de las moléculas similares a esteroles, que en los procariotas, sustituyen a los esteroles de membrana.
hormona: compuesto sintetizado por un órgano que se libera a la sangre, causando un efecto fisiológico en las células o tejidos de otro órgano.
hormona esteroídica: uno de los esteroides derivados del colesterol, que funciona como molécula de señalización, distribuyéndose por vía sanguínea hacia los órganos diana, en los que atraviesa las membranas plasmáticas, e interactúa con los receptores intracelulares, formando complejos receptor-ligando, capaces de activar (o inhibir) la transcripción de determinados genes.
horquilla de replicación: estructura en forma de Y, que coincide con el lugar en el cual se está replicando una doble hélice de DNA.
HPV: *véase papilomavirus humano.*
huella dactilar de DNA: técnica empleada para la identificación de individuos, basada en la detección por electroforesis, de pequeñas diferencias en fragmentos de DNA.
huevo (ovum): gameto femenino haploide; suele ser una célula muy grande, que almacena muchos nutrientes.
huso mitótico: estructura microtubular responsable de de la separación de los cromosomas durante la mitosis.
HVEM: *véase microscopio electrónico de alto voltaje.*

I

IgSF: *véase superfamilia de las inmunoglobulinas.*
IMP: *véase partícula intermembranosa.*
importación cotranslacional: tranferencia de un polipéptido naciente a través de la membrana del RE (o inserción, en el caso de una proteína integral de membrana), a medida que progresa la síntesis del polipéptido.
importación postraducción (postranslacional): importación por los orgánulos de polipéptidos completamente sintetizados, mediante secuencias de señalización específicas del propio polipéptido.
importina: proteína receptora que se une a la secuencia de localización nuclear de proteínas del citosol, llevándolas al núcleo, a través de los complejos del poro nucleares.
impulso nervioso: señal trasmitida a lo largo de las células nerviosas, como una onda de despolarización-repolarización, que se propaga por la membrana del axón.
inactivación de un canal: cierre de un canal iónico, de manera que no pueda reabrirse inmediatamente.
indicador de calcio: colorante o proteína obtenida por ingeniería genética, cuya fluorescencia cambia en respuesta a la concentración local de calcio citosólico.
índice de refracción: medida del cambio de la velocidad de la luz, cuando pasa de un medio a otro.
índice hidropático: valor que representa la media de hidrofobicidad de una secuencia compacta de aminoácidos contiguos, dentro de una proteína.
índice mitótico: porcentaje de células en una población, que están en cualquiera de las etapas de la mitosis en un momento dado; se emplea para hacer una estimación de la longitud relativa de la fase M del ciclo celular.
inducción por sustrato: mecanismo de regulación de rutas catabólicas en el que la síntesis de las enzimas implicadas en una ruta, se estimula en presencia del sustrato, inhibiéndose en su ausencia.
inductor: cualquier efector molecular que activa la transcripción de un operón inducible.
inervar: dotar de nervios a un tejido.
inestabilidad genética: carácter hereditario de las células cancerosas, en virtud del cual las tasas anormalmente altas de mutación tienen su origen en deficiencias en los mecanismos de reparación del DNA o en la segregación de cromosomas.
ingeniería genética: aplicación de la tecnología del DNA recombinante a problemas prácticos, especialmente en medicina y agricultura.
inhibición del crecimiento por contacto: tendencia al cese de las divisiones celulares, cuando un cultivo en desarrollo, alcanza una alta densidad.
inhibición enzimática: disminución de la actividad catalítica de una enzima, bien por cambios en su conformación, bien por modificación de alguno de sus grupos funcionales.
inhibición ***feedback*** **(por producto final):** capacidad que tiene el producto final de una ruta biosintética para inhibir la actividad de la primera enzima de la ruta, asegurándose de esta manera, que el funcionamiento de la ruta será sensible a la concentración intracelular de dicho producto.
inhibición por producto final: *véase inhibición feedback.*
inhibidor controlado por hemo (HCI): proteína quinasa que en ausencia de hemo, cataliza la fosforilación del factor 2 de iniciación (eIF2) de las células eucariotas, inhibiendo la síntesis de proteínas.
inhibidor de Cdk: cualquier proteína capaz de detener el crecimiento y división celulares, a base de inhibir a los complejos Cdk-ciclina.
inhibidor irreversible: molécula que se une covalentemente a una enzima, causando una pérdida irrevocable de la actividad catalítica.
inhibidor reversible: molécula que produce una pérdida reversible de la actividad catalítica, cuando se une a una enzima; tras la disociación del inhibidor, la enzima recupera su función biológica.
iniciación de la carcinogénesis: evolución irreversible de una célula hacia el estado precanceroso, debida a agentes que causan mutaciones en el DNA.
iniciador (Inr): secuencia corta del DNA alrededor del punto de inicio de la transcripción, que forma parte del promotor de la RNA polimerasa II.

inicio de la glicosilación: unión del núcleo del oligosacárido a un polipéptido naciente en la luz del retículo endoplásmico.
inmunofluorescencia indirecta: tipo de microscopia de fluorescencia en la que la muestra se expone primero a un anticuerpo no marcado, que se une a los antígenos del tejido y luego se tiñe con un anticuerpo secundario, fluorescente, que se une al primer anticuerpo.
inmunomicroscopia electrónica: técnica de microscopia electrónica que permite la visualización de anticuerpos, uniéndolos a sustancias densas a los electrones, que aparecen como puntos opacos.
inmunoterapia: tratamiento de una enfermedad, como el cáncer, estimulando al sistema inmunológico o administrando anticuerpos producidos por el sistema inmunológico.
inmunotinción: técnica microscópica de viasulización de anticuerpos marcados con fluoróforos.
inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3): molécula de inositol triplemente fosforilada, formada por la hidrólisis, catalizada por la fosfolipasa C, del fosfatidilinositol-4,5-bifosfato; funciona como segundo mensajero, induciendo la liberación de los iones calcio almacenados en el retículo endoplásmico.
Inr: *véase iniciador.*
integrina: uno de los receptores de membrana que se unen a componentes de la matriz extracelular -hacia la cara externa de la célula- y a proteínas del citoesqueleto -hacia la cara interna; incluye a los receptores de fibronectina, laminina y colágeno.
interacción de van der Waals: interacción débil entre dos átomos, debida a las asimetrías transitorias en la distribución de cargas de cada átomo.
interacción heterofílica: unión entre dos moléculas diferentes. *Véase también interacción homofílica.*
interacción hidrófoba: tendencia de los grupos hidrófobos a ser excluidos de las interacciones con moléculas de agua.
interacción homofílica: unión entre dos moléculas iguales. *Véase también interacción heterofílica.*
interfase: fase de crecimiento en el ciclo de una célula eucariota, situada entre dos fases de división (fases M); está formada por las etapas G1, S y G2.
interferencia: fenómeno por el cual dos o más ondas de luz se combinan, reforzándose o anulándose y produciendo una onda equivalente a la suma de ambas.
interneurona: célula nerviosa que procesa señales recibidas de otras neuronas y que distribuye la información por otras partes del sistema nervioso.
intrón: secuencia de nucleótidos en una molécula de RNA, que forma parte del tránscrito primario, pero no de la molécula madura y funcional del RNA. *Véase también exón.*
invasión: colonización, por células cancerosas, de los tejidos próximos.
ionóforo de calcio: molécula que incrementa la permeabilidad de una membrana a los iones de calcio.
IP_3: *véase inositol-1,4,5-trifosfato.*
IP_3, receptor: canal de calcio de la membrana del RE dependiente de ligando, que se abre en presencia de IP_3, permitiendo que los iones de calcio pasen del citosol a la luz del retículo.
IPSP: *véase potencial postsináptico inhibidor.*
IRE: *véase elemento de respuesta a hierro.*
isoenzima: cada una de las diferentes proteínas que catalizan una misma reacción.

J

J: *véase julio.*
Jak: *véase quinasa Janus.*
julio (J): unidad de energía equivalente a 0,239 calorías.

K

Kb: kilobases; miles de pares de bases.
k_{cat}: *véase número de recambio.*
K_d: *véase constante de disociación.*
K_{eq}: *véase constante de equilibrio.*
KIF: *véase quinesinas, familia.*
K_m: *véase constante de Michaelis.*

L

lamelipodio (en latín, **lamellipodium**, plural, **lamellipodia**)**:** lámina fina de citoplasma, que producen transitoriamente las células cuando «reptan» sobre un sustrato; está soportada por filamentos de actina.
lámina β: *véase lámina beta.*
lámina basal: hoja muy fina de la matriz extracelular especializada, que separa a las células epiteliales del tejido conjuntivo subyacente.
lámina beta (lámina β): estructura secundaria de proteínas, con forma de lámina, en la cual los polipéptidos adyacentes se unen por puentes de hidrógeno establecidos entre residuos amino y carboxilo.
lámina media: es la primera capa que se sintetiza de la pared celular vegetal; se sitúa justo por fuera de la membrana plasmática, donde sirve para unir células adyacentes.
lámina nuclear: red densa y fina de fibras que limitan y soportan la superficie interna de la envuelta nuclear.
laminina: glicoproteína adhesiva de la matriz extracelular, localizada predominantemente en la lámina basal de las células epiteliales.
lanzadera de electrones: cualquiera de los mecanismos por los cuales los electrones de una coenzima reducida, tal como la NADH, atraviesan una membrana; está formada por proteínas de transporte, presentes en la membrana, asociadas a transportadores de electrones, que pueden estar en la forma oxidada o reducida.
lanzadera del glicerol fosfato: mecanismo de transporte de electrones desde el NADH del citosol hacia la mitocondria, en la que los electrones se transfieren al FAD, en los complejos respiratorios.
latrunculina A: compuesto químico obtenido de esponjas marinas, que causa la despolimerización de los microfilamentos de actina.
lazo ahorquillado: estructura en forma de lazo que aparece cuando dos segmentos adyacentes de un ácido nucleico, se repliegan sobre sí mismos; esta estructura se mantiene estable gracias a fenómenos de complementariedad de bases.
lazo cromosómico: región descondensada, y en transcripción, de un cromosoma politénico.
LDL: *véase lipoproteínas de baja densidad.*
lectina: proteínas que se unen a carbohidratos; son propias tanto de células animales, como vegetales y promueven la adhesión célula a célula.
lente condensadora: lente de un microscopio óptico (o electrónico), que concentra los rayos de luz (o el haz de electrones) sobre la muestra.
lente de proyección: lente electromagnética situada entre la lente intermedia y la pantalla de proyección de un microscopio electrónico.
lente intermedia (microscopio electrónico): lente electromagnética situada entre el objetivo y las lentes de proyección, de un microscopio electrónico.
lente intermedia (microscopio óptico): lente situada entre las lentes ocular y objetivo, de un microscopio óptico.
lente objetivo (microscopio electrónico): lente electromagnética en el interior de la cual se sitúa el espécimen, en un microscopio electrónico de transmisión.
lente objetivo (microscopio óptico): lente dispuesta justo por encima de la muestra, en un microscopio óptico.
lente ocular: lente por la cual mira el observador en un microscopio óptico.
leptotene: primera etapa de la profase I de la meiosis, caracterizada por la condensación de las fibras de cromatina en cromosomas.
leucemia: cáncer de origen sanguíneo o linfático, en el que las células cancerosas proliferan y residen principalmente en la sangre, en vez de formar masas sólidas del tejido.
ley: teoría que ha sido comprobada y confirmada repetidamente, durante un largo período de tiempo y por muchos investigadores y de cuya veracidad, no hay virtualmente dudas.
ley de Chargaff's: observación descrita por Erwin Chargaff, que constata que en el DNA, el número de adeninas es igual al de timinas (A = T), y el de guaninas igual al de citosinas (G = C.
ley de la independencia de caracteres: principio que define que los alelos de cada gen se separan independientemente de los alelos de otros genes.
ley de segregación: principio que define que los alelos de cada gen se separan (segregan) durante la formación de los gametos.
leyes de Mendel de la herencia: principios derivados de los trabajos de Mendel sobre la herencia de caracteres en guisantes. *Véase también ley de segregación* y *ley de la independencia de caracteres.*
LHC: *véase complejo recolector de luz.*
LHCI: *véase complejo recolector de luz I.*
LHCII: *véase complejo recolector de luz II.*
licencia: facultad de hacer al DNA competente para la replicación; normalmente sólo ocurre una vez en cada ciclo celular.
ligando: sustancia que se une a un receptor específico, iniciando un evento o serie de eventos, de los cuales el receptor es responsable.
lignina: conjunto de polímeros de alcoholes aromáticos insolubles, presentes en los tejidos leñosos de plantas; contribuyen al endurecimiento de la pared celular y confieren su resistencia característica a la madera.
límite de resolución: medida de la separación mínima que deben tener dos objetos adyacentes, para ser observados como entidades separadas.

línea M: línea oscura situada en la mitad de la zona H de las miofibrillas de las células musculares estriadas.
línea Z: línea oscura en medio de la banda I de una miofibrilla de músculo estriado; define el límite de un sarcómero.
linfocito T citotóxico: célula del sistema inmunológico, especializada en el ataque a células exógenas o anormales, o a células que han sido infectadas con una bacteria o un virus.
linfoma: cáncer de origen linfático en el que las células cancerosas crecen como masas sólidas del tejido.
linfoma de Burkitt: linfoma asociado al virus de Epstein-Barr, caracterizado por una translocación cromosómica del gen *MYC* del cromosoma 8 al 14, que implica su activación constitutiva.
lípido: miembro de una extensa clase de compuestos químicos orgánicos, que son poco solubles o insolubles en agua, pero solubles en disolventes orgánicos.
lipoproteínas de alta densidad (HDL): complejos de lípidos y proteínas que transportan el colesterol por la sangre, desde donde son tomados por las células; su alta densidad se debe a que contienen poco colesterol.
lipoproteínas de baja densidad (LDL): complejos de lípidos y proteínas que transportan colesterol por el torrente sanguíneo y que son tomados por las células; su baja densidad se debe a su alto contenido en colesterol.
lisosoma: orgánulo de membrana que contiene enzimas digestivas capaces de degradar a la mayoría de las macromoléculas biológicas.
lisosoma autofágico: lisosoma maduro que contiene las enzimas hidrolíticas implicadas en la digestión de materiales de origen intracelular. *Véase también lisosoma heterofágico.*
lisosoma heterofágico: lisosoma maduro que contiene las enzimas hidrolíticas implicadas en la digestión de materiales de origen extracelular. *Véase también lisosoma autofágico.*
locus génico (plural, **loci**)**:** lugar de un cromosoma que contiene la secuencia de DNA de un gen determinado.
locus *MAT*: lugar del genoma de las levaduras, donde reside el alelo activo para la conjugación.
longitud de onda: distancia entre las crestas de dos ondas sucesivas.
longitud focal: distancia entre el eje de una lente y el punto en el cual, los rayos que atraviesan la lente, convergen en foco.
lumen: espacio interno o luz, limitado por membrana, generalmente del retículo endoplásmico o de sistemas de membranas relacionados.
luz del RE: espacio interno encerrado por las membranas del retículo endoplásmico.
luz del tilacoide: espacio encerrado por la red interconectada de grana y tilacoides del estroma.

M

macroautofagia: proceso en el cual un orgánulo queda rodeado por una membrana doble derivada del retículo endoplásmico, dando lugar a una vacuola autofágica, que adquiere las enzimas lisosomales que degradan el orgánulo.
macromolécula: polímero formado por unidades repetitivas de un monómero, con pesos moleculares que van desde unos cuantos miles a cientos de millones.
macromolécula de almacenamiento: polímero consistente en uno o unos pocos tipos de subunidades, sin orden especificado, que sirven para almacenar monosacáridos, como el almidón o el glucógeno.
macromolécula de información: polímero de unidades no idénticas, ordenadas en una secuencia no aleatoria, que lleva información importante de la función o empleo de la macromolécula. Los ácidos nucleicos y las proteínas, son macromoléculas de información.
macromolécula estructural: polímero consistente en uno o unos pocos tipos de subunidades, sin orden especificado, que sirven para proveer a la célula de estructura y resistencia mecánica; como ejemplos están la celulosa y las pectinas.
MAP: *véase proteína asociada a microtúbulos.*
MAP no motora: proteína asociada a microtúbulos, que en lugar de intervenir en procesos de motilidad, controla la organización de los microtúbulos.
MAP quinasa: *véase proteína quinasa activada por mitógenos.*
mapa de restricción: mapa de una molécula de DNA, en el que se señalan los lugares de corte de varias enzimas de restricción.
mapeo genético: determinación del orden secuencial y el espaciado entre los genes de un cromosoma, basada en las frecuencias de recombinación.
MAPK: *véase proteína quinasa activada por mitógenos.*
marcador selectivo: gen cuya expresión permite a las células crecer en condiciones que serían restrictivas en caso de carecer de dicho gen.
material pericentriolar: material granular difuso alrededor de centriolos del centrosoma de las células animales.
matriz: sustancia semifluida y sin estructurar que ocupa el interior de la mitocondria.
matriz extracelular (ECM): material segregado por las células animales, que rellena los espacios entre células vecinas; está formada por una mezcla de proteínas estructurales (por ejemplo, colágeno y elastina) y glicoproteínas adhesivas (por ejemplo, fibronectina y laminina), embebidas en una matriz compuesta por complejos de proteínas y polisacáridos, denominados proteoglicanos.
matriz nuclear: red fibrosa insoluble que sirve como trama de soporte del núcleo.
máximo rendimiento de ATP: máxima cantidad de ATP producida por cada molécula de glucosa, que se oxida durante la respiración aerobia; suele ser de 38 moléculas de ATP en células procariotas y entre 36 y 38 en células eucariotas.
Mb: megabases; millones de pares de bases.
MDR: *véase proteína de transporte de resistencia a multidrogas.*
mecanismo de casete: proceso de reordenación del DNA en el cual los alelos alternativos que definen el género de una levadura, se insertan, para su transcripción, en el *locus MAT*.
mecanismo de compuerta de un canal: consiste en el cierre de un canal iónico de membrana, de forma que pueda ser reabierto inmediamente, en respuesta a un estímulo apropiado.
mecanoenzima: *véase proteína motora.*
Mediador: gran complejo multiproteico que funciona como coactivador, actuando como un «puente» que se une tanto a las proteínas activadoras asociadas con el amplificador, como a la RNA polimerasa.
meiosis: serie de dos divisiones celulares, precedidas por una única fase de replicación del DNA; convierte a una célula diploide en cuatro células haploides (o núcleos haploides).
meiosis I: la primera de las divisiones meióticas, que produce dos células haploides, con cromosomas formados por cromátidas hermanas.
meiosis II: la segunda de las divisiones meióticas, en la cual se separan las cromátidas hermanas de la célula haploide generada en la primera división.
membrana: barrera de permeabilidad que rodea y delimita a las células y orgánulos; formada por una bicapa lipídica, con proteínas asociadas.
membrana celular: *véase membrana plasmática.*
membrana externa: la más externa de las dos membranas que rodean a mitocondrias, cloroplastos y núcleo.
membrana interna: la membrana interna de las dos que rodean a la mitocondria, el cloroplasto o el núcleo.
membrana intracelular: cualquier membrana celular interna a la membrana plasmática; sirve para compartimentar funciones dentro de las células eucariotas.
membrana plasmática: bicapa de lípidos y proteínas que define el límite de la célula y regula el flujo de entrada y salida de materiales; se denomina también membrana celular.
metabolismo: conjunto de reacciones químicas que tienen lugar dentro de una célula.
metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM): ruta en la cual las plantas se valen de la enzima PEP carboxilasa para fijar CO_2 durante la noche, generando el ácido de cuatro carbonos malato . Éste se descarboxila posteriormente durante el día, liberando el CO_2, que es fijado en el ciclo de Calvin.
metabolismo de energía quimiotrofa: reacciones y rutas por las que las células catabolizan nutrientes como carbohidratos, lípidos y proteínas, transformando en ATP parte de la energía liberada en el proceso.
metafase: etapa de la mitosis o la meiosis durante la cual los cromosomas se alinean en el ecuador del huso.
metástasis: dispersión de células tumorales hacia órganos distantes, a través de la sangre u otros fluidos del cuerpo
metilación del DNA: adición de grupos metilo al DNA; cuando tiene lugar en citosinas, se produce la supresión de la transcripción génica.
método científico: aproximación al desarrollo de nuevos conocimientos basada en la observación, la formulación de hipótesis, el diseño de experimentos, la recolección de datos, la interpretación de resultados y la extracción de conclusiones.
MF: *véase microfilamento.*
MHC: *véase complejo mayor de histocompatibilidad.*
***microarray* de DNA:** microplaca («chip») empleada en los estudios de la expresión génica, que ha sido salpicada, en localizaciones precisas, con miles de fragmentos diferentes de DNA.; se emplea en los estudios de expresión génica.

microautofagia: proceso por el cual los lisosomas capturan y degradan proteínas del citosol.
microcuerpo: término en desuso, acuñado para definir a un peroxisoma en base a su apariencia en las micrografías electrónicas.
microfibrilla: agregado de varias docenas de moléculas de celulosa, estabilizadas lateralmente por puentes de hidrógeno; sirven como componentes estructurales de las paredes vegetales de plantas y hongos.
microfilamento (MF): polímero de actina, de un diámetro aproximado de 7 nm, que forma parte del citoesqueleto y contribuye a dar soporte, forma y movilidad a las células eucariotas.
micrografía electrónica: imagen fotográfica de una muestra, producida por la exposición de una placa fotográfica al haz de electrones que forma la imagen en un microscopio electrónico.
micrómetro (μm): unidad de medida: 1 micrómetro = 10^{-6} metros.
microRNA: RNAs de cadena sencilla, de unos 19-25 nucleótidos de longitud, producidos por genes de la célula, con el propósito de inhibir la traducción de mRNAs producidos por otros genes.
microscopia correlativa: combinación de las microscopias óptica y electrónica, que permite la observación de alta resolución de una estructura asociada a una señal fluorescente; a menudo se vale de la inmunomicroscopia electrónica.
microscopia de campo claro: microscopia lumínica de una muestra que posee color, ha sido teñida o presenta cualquier otra propiedad que afecta a la cantidad de luz que pasa a su través, permitiendo así la formación de imágenes.
microscopia de contraste de fases: técnica de microscopia óptica, que aumenta el contraste de la muestra, sin necesidad de tinción, explotando las diferencias en grosor e índices de refracción; la imagen se produce haciendo que los rayos no difractados estén en fase con aquellos que ha difractado la muestra.
microscopia de contraste interferencial diferential: técnica que recuerda a la microscopia de contraste de fases, pero que es más sensible, pues se sirve de un prisma especial, que desdobla en dos el haz de luz incidente.
microscopia de fluorescencia: técnica de microscopia óptica consistente en la concentración de rayos ultravioleta sobre la muestra, haciendo que los componentes fluorescentes de la misma, emitan luz visible.
microscopia de reflexión interna total fluorescente (TIRF): técnica en la cual un haz de luz se proyecta sobre la interfase de dos medios de diferente índice de refracción, con un ángulo superior al ángulo crítico, haciendo que la luz se refleje sobre medio de incidencia; el "campo evanescente" que se desarrolla en la interfase, permite la excitación selectiva de moléculas fluorescentes localizadas en un radio de unos 100 nm.
microscopia DIC : *véase microscopia de contraste interferencial diferential.*
microscopia digital de deconvolución: técnica por la cual se adquiere una serie de imágenes de los diferentes planos de una muestra, que son luego procesados en un ordenador, para eliminar las zonas que están fuera de foco en cada uno de los planos.
microscopia multifotónica: microscopia de fluorescencia que utiliza como iluminación un haz láser pulsátil; las imágenes son similares a las de la microscopia confocal, pero el fotoblanqueo de la muestra es mucho menor, debido a la virtual ausencia de luz fuera de foco.
microscopio compuesto: microscopio óptico, que combina varias lentes; generalmente tiene lentes condensadoras, objetivos y oculares.
microscopio confocal: microscopio óptico que emplea un haz láser para iluminar un solo plano de la muestra, en un momento dado.
microscopio electrónico: instrumento que emplea electrones para la observación de estructuras celulares y de la arquitectura celular; la resolución es mucho mejor que la de los microscopios ópticos, permitiendo el examen ultraestructural detallado.
microscopio electrónico de alto voltaje (HVEM): microscopio electrónico que emplea voltajes de aceleración del orden de 1000 o más kilovoltios, permitiendo el examen de muestras más gruesas que las habituales de microscopia electrónica.
microscopio electrónico de barrido (SEM): microscopio en el que el haz de electrones barre la superficie de una muestra, formándose la imagen a partir de los electrones que parten de la superficie externa de dicha muestra.
microscopio electrónico de transmisión (TEM): tipo de microscopio electrónico en el cual la imagen se forma por los electrones que son transmitidos al atravesar la muestra.
microscopio óptico (o lumínico): instrumento que posee una fuente de iluminación y un sistema de lentes de vidrio que permiten amplificar la imagen de una muestra.
microsomas: vesículas formadas por fragmentos del retículo endoplásmico, cuando se homogeiniza un tejido
microtomo: instrumento usado para obtener secciones finas de muestras biológica, previamente embebidas en un medio apropiado, y que serán observadas con el microscopio óptico.
microtúbulo (MT): polímero de la proteína tubulina, de unos 25 nm de diámetro, que forma parte integral del citoesqueleto y contribuye a dar soporte, forma y motilidad a las células eucariotas; está también presente en cilios y flagelos.
microtúbulos astrales: tipo de túbulos propios del áster, constituido a su vez por una densa corona microtubular que irradia desde cada uno de los polos del huso acromático.
microtúbulos citoplásmicos: microtúbulos dispuestos en redes laxas y dinámicas, distribuídas por el citoplasma de las células eucariotas.
microtúbulos del axonema: microtúbulos presentes en haces altamente ordenados, en el axonema de cilios y flagelos de células eucariotas.
microtúbulos del cinetocoro: microtúbulos del huso que se unen a la región centromérica del cromosoma.
microtúbulos polares: microtúbulos del huso acromático que interaccionan con los correspondientes del polo opuesto.
microvellosidad (en latín, **microvillus**, plural, **microvilli):** prolongación digitiforme de la superficie celular que incrementa el área de la misma; propio de células que absorben del medio, como por ejemplo las que tapizan el intestino.
miofibrilla: estructura cilíndrica formada por un haz de filamentos finos de actina y gruesos de miosina; propia del citoplasma de células musculares esqueléticas.
miosina: familia de proteínas motoras que producen movimiento ejerciendo fuerzas sobre los microfilamentos de actina, con consumo de energía proveniente de la hidrólisis del ATP; hace que los filamentos gruesos desplacen a los filamentos finos de actina, durante la contracción muscular.
miosina tipo II: forma de miosina compuesta por cuatro cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, cada una con una cabeza globular, una región de articulación y una cola recta y larga; presente en las células musculares esqueléticas, cardiacas y lisas, así como en células no musculares.
mitocondria : orgánulo citoplásmico de membrana doble, donde tiene lugar la respiración aerobia y, por tanto, la generación de ATP.
mitosis: proceso por el cual un núcleo se divide, dando lugar a dos núcleos hijos genéticamente idénticos, mediante la segregación, a cada uno de ellos, de los cromosomas previamente duplicados; suele ser seguida de la división celular
modelo combinatorio de regulación génica: modelo que propone que los patrones complejos de expresión génica específica de cada tejido, pueden deberse a una colección relativamente pequeña de elementos de control de DNA y sus respectivos factores de transcripción, actuando de forma combinatoria.
modelo de acoplamiento quimiosmótico: modelo que supone que las rutas de transporte de electrones establecen un gradiente de protones a través de una membrana y que la energía almacenada en dicho gradiente, se puede emplear en la síntesis de ATP.
modelo de ajuste inducido: modelo que presupone que el sitio activo de una enzima es relativamente poco específico para el sustrato antes de que éste se una, pero que la especificidad aumenta después de la unión, debido a un cambio conformacional en la enzima, inducido por el sustrato.
modelo de cisternas estacionarias: modelo que propone que cada compartimiento del Golgi es una estructura estable y el tráfico entre las sucesivas cisternas está mediado por vesículas «lanzaderas» que parten de una cisterna y se fusionan con otra.
modelo de deslizamiento de microfilamentos: modelo que establece que la contracción muscular está causada por el deslizamiento de los filamentos finos de actina sobre los gruesos de miosina, sin que se produzcan cambios en la longitud de los filamentos.
modelo de deslizamiento de microtúbulos: modelo de movimiento de cilios y flagelos de células eucariotas, que propone que la longitud de los microtúbulos permanece constante, mientras que los microtúbulos de los dobletes externos adyacentes se deslizan unos sobre otros, haciendo que se doblen, puesto que están unidos por conexiones laterales entre ellos y radiales con el par central.

modelo de fusión transitoria: modelo que propone que los endosomas establecen conexiones transitorias con los lisosomas, con el fin de transferir el material; conocido también como modelo de "bésala y corre" .

modelo de inestabilidad dinámica: modelo del comportamiento de los microtúbulos, que presupone la existencia de dos poblaciones de éstos, una elongadose por polimerización en su extremo *más* y la otra acortándose por despolimerización .

modelo de maduración cisternal: modelo que propone que las cisternas del Golgi son compartimientos transitorios, que cambian gradualmente desde la red *cis*-Golgi hacia las cisternas mediales y, finalmente, hacia la red *trans*-Golgi.

modelo de mosaico fluido: modelo de estructura de la membrana, consistente en una bicapa lipídica, donde las proteínas constituyen entidades globulares discretas, que se insertan en la bicapa con diferente grado de penetración, pero manteniendo la capacidad de desplazarse lateralmente.

modelo híbrido: modelo que propone que los endosomas tardíos y los lisosomas se fusionan para formar orgánulo híbrido, en el cual los lípidos y las proteínas de ambos, no están claramente segregados.

modificación covalente: tipo de regulación en la cual la actividad de una enzima (u otra proteína) se altera por la adición o sustracción de grupos químicos específicos.

molde (*template*): ácido nucleico cuya secuencia de bases sirve como muestra para la síntesis de otro ácido nucleico (complementario).

molécula anfipática: molécula que presenta regiones hidrófilas e hidrófobas, separadas en el espacio.

molécula de DNA recombinante: molécula de DNA que contiene secuencias derivadas de dos fuentes distintas.

molécula transportadora: molécula que se une a un monómero, dejándolo activo para una reacción subsiguiente.

monómero: molécula orgánica pequeña que sirve como subunidad para el ensamblaje de una macromolécula orgánica.

monómero activado: monómero cuya energía libre aumenta tras unirse a una molécula transportadora.

monosacárido: azúcar sencillo; la unidad que se repite en los polisacáridos.

motilidad celular: movimiento o acortamiento de una célula, de los componentes del interior de una célula o de los componentes del medio que pasan alrededor o a través de una célula.

motivo: región de la estructura secundaria de una proteína, formada por pequeños segmentos en hélices α o láminas β, conectados por lazos de longitud variable.

motores MAP (proteínas motoras asociadas a microtúbulos): proteínas como la quinesina o la dineína, que utilizan la energía del ATP para transportar vesículas y orgánulos a lo largo de los microtúbulos, o para generar fuerzas de deslizamiento entre los microtúbulos.

movimiento ameboide: modo de locomoción celular dependiente de pseudópodos y que incluye ciclos de transición gel-sol del citoesqueleto de actina.

movimientos basados en microfilamentos: están producidos por la interacción entre actina y miosina; son la contracción muscular, el movimiento ameboide, las corrientes citoplásmicas y la citocinesis de células animales.

movimientos basados en microtúbulos: son los movimientos de cilios y flagelos y de la cola de los espermatozoides, así como los movimientos de los cromosomas, mediados por los microtúbulos del huso.

MPF: complejo de Cdk mitótica y ciclina, que dirige la progresión desde la fase G2 hacia la mitosis, fosforilando proteínas implicadas en las etapas clave.

mRNA, lugar de unión: lugar en el ribosoma al cual se une el mRNA, durante la síntesis de proteínas.

mRNA: *véase RNA mensajero.*

mRNA policistrónico: molécula de mRNA que codifica más de un polípéptido.

MT: *véase microtúbulo.*

MTOC: *véase centro organizador de microtúbulos.*

músculo cardíaco: músculo estriado del corazón, dependiente estricto de la respiración aerobia.

músculo esquelético: tipo de músculo de apariencia estriada al microscopio, que es responsable de los movimientos voluntarios.

músculo estriado: músculo cuyas miofibrillas exhiben un patrón alternante de bandas claras y oscuras, cuando se observa en el microscopio; comprende a los músculos esquelético y cardíaco.

músculo liso:músculo que carece de estriaciones y es responsable de la contracción involuntaria de órganos, tales como el estómago, el intestino, el útero o los vasos sanguíneos.

mutación: cambio en la secuencia de bases de una molécula de DNA.

mutación de cambio de cuadro: inserción o pérdida de uno o más pares de bases en una molécula de DNA, que provoca un cambio en el cuadro de lectura del mRNA, impidiendo, casi siempre, su traducción.

mutación dominante negativa: mutación de pérdida de función, propia de proteínas que están formadas por más de una copia de la misma cadena polipeptídica; la presencia de una única cadena mutada, es suficiente para interrumpir la función de la proteína, aunque las otras cadenas polipeptídicas sean normales.

mutación puntual: mutación de una única base (o par de bases) del DNA.

mutación sin sentido: cambio en la secuencia de bases, que convierte a un codón, previamente codificante, en un codón de parada.

mutagénesis dirigida: técnica para alterar la secuencia de bases en un lugar determinado del genoma, originando una mutación, cuyos efectos son luego analizados.

mutagénesis por inserción: cambio en la estructura o actividad de un gen, por la inserción de un DNA exógeno, generalmente un virus.

mutágeno: agente físico o químico, capaz de inducir mutaciones.

mutante sensible a la temperatura: célula que sintetiza una proteína que funciona apropiadamente a temperaturas normales, pero que es deficiente cuando se produce una ligera modificación en la temperatura.

N

NA: *véase apertura numérica.*

NAD$^+$: *véase dinucleótido de nicotinamida y adenina.*

NADH-coenzyme Q oxidoreductase: *véase complejo I.*

NADP$^+$: *véase dinucleótido de nicotinamida y adenina fosforilado.*

nanómetro (nm): unidad de medida: 1 manómetro = 10^{-9} metros

NER: *véase reparación por escisión de nucleótidos.*

nervio: tejido compuesto por haces de axones.

NES: *véase señal de exportación nuclear.*

neurona: célula especializada, directamente implicada en la transmisión de impulsos nerviosos; célula nerviosa.

neurona motora: célula nerviosa que transmite impulsos desde el sistema nervioso central hacia músculos o glándulas

neurona postsináptica: neurona que recibe una señal de otra neurona, a través de una sinapsis.

neurona presináptica: neurona que transmite la señal a otra neurona, por medio de una sinapsis.

neurona sensitiva: célula nerviosa especializada en la detección de diferentes tipos de estímulos.

neuropéptido: péptido corto especializado en la transmisión de señales desde una neurona a otra neurona o a otro tipo celular.

neurotoxina: sustancia tóxica que interrumpe la transmisión del impulso nervioso.

neurotransmisor: sustancia liberada por una neurona, que transmite el impulso nervioso en la sinapsis.

nexina: proteína que interconecta y mantiene la relación espacial de los dobletes externos, en el axonema de cilios y flagelos.

NLS: *véase señal de localización nuclear.*

NO: *véase óxido nítrico.*

no disyunción: deficiencia en la separación de los dos miembros de un par de cromosomas homólogos, durante la anafase I de la meiosis, con el resultado de que el par completo es heredado por una de las células hijas.

nocodazol: droga sintética que inhibe el ensamblaje de microtúbulos; a diferencia de la colchicina, sus efectos son revertidos más fácilmente, por lo que suele ser más usada que aquélla.

nódulo de Ranvier: pequeño sector de axón desnudo, entre los sucesivos segmentos de envueltas de mielina.

NOR: *véase región de organización nucleolar.*

NPC: *véase complejo del poro nuclear.*

NSF: *véase factor sensible a N-etilmaleimida.*

N-terminal (amino terminal): extremo de una cadena polípeptídica, que contiene el primer aminoácido incorporado durante la traducción del mRNA; suele retener un grupo amino libre.

nucleación: fenómeno de polimerización, a partir de un pequeño agregado de moléculas.

núcleo: orgánulo voluminoso, rodeado de una membrana doble, que contiene el DNA cromosómico de las células eucariotas.

núcleo del oligosacárido: oligosacárido inicial que se une, por un residuo de asparagina, a una cadena polipeptídica, durante la glicosilación en N; está formado por dos unidades de N-acetilglucosamina, nueve de manosa y tres de glucosa.

núcleo promotor: conjunto mínimo de secuencias de DNA suficiente para que que la RNA polimerasa inicie la transcripción.

nucleoide: región citoplásmica en la que se localiza el material genético de las células procariotas.

nucleolo: estructura grande y esférica presente en el núcleo de las células eucariotas; es el lugar de síntesis y procesamiento del RNA ribosómico y donde se ensamblan las subunidades del ribosoma.
nucleoplasma: espacio interno del núcleo, no ocupado por el nucleolo.
nucleósido: molécula formada por una base nitrogenada (purina o pirimidina) unida a un azúcar de cinco carbonos (ribosa o desoxirribosa); nucleótido defosforilado.
nucleósido monofosfato: *véase nucleótido.*
nucleosoma: unidad estructural básica de los cromosomas eucarióticos, formado por unos 200 pares de bases de DNA, en asociación con un octámero de histonas.
nucleótido: molécula formada por una base nitrogenada (purina o pirimidina) unida a un azúcar fosforilado de cinco carbonos (fosforibosa o fosfodesoxirribosa); se denomina también nucleósido monofosfato.
número de recambio (k_{cat})**:** tasa de conversión de un sustrato en producto, por la acción de una única molécula enzimática, cuando la enzima está funcionando a su máxima velocidad.

O

OEC: *véase complejo productor de oxígeno.*
oligodendrocito: tipo celular del sistema nervioso central, que forma la envuelta de mielina que rodea a los axones.
oncogen: gen cuya presencia puede causar cáncer; se forma como consecuencia de la mutación de genes normales, que se denominan proto-oncogenes.
operador: secuencia de bases del operón a la que se puede unir una proteína represora.
operón: grupo de genes con funciones relacionadas, que están bajo el control de un único operador y promotor, de manera que la transcripción de los mismos se enciende y apaga conjuntamente.
operón inducible: grupo de genes contíguos, cuya transcripción se activa por un inductor.
operón *lac*: grupo de genes bacterianos que codifican las enzimas implicadas en el metabolismo de la lactosa y cuya transcripción se inhibe selectivamente por el represor *lac*.
operón reprimible: grupo de genes asociados que normalmente son transcritos, pero que pueden ser inhibidos por la presencia de un correpresor.
operón *trp*: grupo de genes bacterianos próximos, que codifican las enzimas implicadas en la biosíntesis del triptófano y cuya transcripción se inhibe selectivamente en presencia del aminoácido.
organismo facultativo: organismo que puede funcionar tanto en modo aeróbico, como anaeróbico.
orgánulo: estructura intracelular discreta, especializada en una función particular. Las células eucariotas tienen varios tipos de orgánulos rodeados de membrana, entre los que se incluyen el núcleo, las mitocondrias, el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi. Los ribosomas, microtúbulos y microfilamentos son ejemplos de orgánulos sin membrana.
orgánulo semiautónomo: mitocondria o cloroplasto que contiene DNA y, en consecuencia, es capaz de codificar algunos de sus polipéptidos, si bien es dependiente del genoma nuclear para codificar la mayoría de ellos.
origen de replicación: secuencia específica de bases de una molécula de DNA, en la cual se inicia la replicación.
origen de transferencia: lugar del plásmido factor F, a partir del cual se inicia la transferencia del mismo, desde una bacteria donante F^+ a otra receptora F^-, durante el proceso de conjugación.
osmolaridad: relación entre las concentraciones de soluto a un lado y otro de una membrana; dirige el movimiento osmótico de agua a través de dicha membrana.
ósmosis: movimiento de agua a través de una membrana semipermeable, impulsado por las diferencias de concentración de un soluto a ambos lados de la membrana.
ovum: *véase huevo.*
oxidación: reacción química consistente en la pérdida de electrones; la oxidación de las moléculas orgánicas, implica en general la pérdida, tanto de electrones, como de iones de hidrógeno (protones), por lo que también se denomina reacción de deshidrogenación. *Véase también beta oxidación.*
oxidasa terminal: complejo de transferencia de electrones que es capaz de llevarlos directamente hasta el oxígeno. Citemos como ejemplo al complejo IV (citocromo *c* oxidasa) del sistema mitocondrial de transporte de electrones.
óxido nítrico (NO): molécula gaseosa que transmite señales a las células vecinas, estimulando a la guanilil ciclasa.
oxidorreductasa coenzima Q-citocromo *c*: *véase complejo III.*

P

p21: inhibidor de Cdk, que detiene la progresión del ciclo celular, actuando sobre diferentes complejos Cdk-ciclinas.
***p53*, gen:** gen supresor de tumores que codifica la proteína p53, factor de transcripción cuya función es prevenir que proliferen las células genéticamente dañadas; es el gen más frecuentemente mutado en cánceres humanos.
p53, proteína: factor de transcripción que se acumula cuando hay daños en el DNA, activando genes cuyos productos detienen el ciclo celular y desencadenan la apoptosis.
P680: par de moléculas de clorofila que configuran el centro de reacción del fotosistema II.
P700: par de moléculas de clorofila que configuran el centro de reacción del fotosistema I.
P, cara: cara interior o citoplásmica de la monocapa interna de una membrana, revelada por la técnica de la criofractura; se denomina cara P porque esta monocapa se sitúa hacia el lado *protoplásmico* de la membrana.
P, sitio (sitio peptidil): lugar del ribosoma que contiene el péptido naciente al principio de cada ciclo de elongación.
papilomavirus humano (HPV): virus responsable del cáncer de cuello de útero; posee oncogenes que bloquean la acción de las proteínas producidas por los genes supresores de tumores *RB* and *p53*.
paquitene: etapa de la profase I de la meiosis, en la que tiene lugar el sobrecruzamiento de cromosomas homólogos.
par central: par de microtúbulos paralelos localizados en el centro del axonema de cilios y flagelos de células eucariotas.
par clorofílico especial: par de moléculas de clorofila localizadas en el centro de reacción de un fotosistema, que cataliza la conversión de energía solar en energía química.
par de bases (pb): par de núcleotidos unidos por puentes de hidrógeno complementarios.
par de oxidación-reducción: *véase par redox.*
par redox: par de moléculas o iones que se pueden interconvertir, por la ganancia o pérdida de electrones; también llamado par de óxido-reducción.
pared celular: estructura inerte rígida, situada por fuera de la membrana plasmática de bacterias, algas, hongos y células vegetales; la pared de las células vegetales está formada por microfibrillas de celulosa embebidas en una matriz no celulósica.
pared celular primaria: porción flexible de la pared vegetal, que se desarrolla por debajo de la lámina media, mientras se produce el crecimiento celular; contiene una red laxa de microfibrillas de celulosa.
pared celular secundaria: parte rígida de la pared celular de vegetales, que se desarrolla por debajo de la pared primaria, una vez que la célula ha cesado su crecimiento; está formada por haces altamente ordenados de microfibrillas de celulosa, que se empaquetan densamente.
partícula intermembranosa: proteína integral de membrana, visible como una partícula, en preparaciones obtenidas por el método de criofractura.
partícula RNP: partícula formada por la unión de proteínas no-snRNP a un pre-mRNA o un mRNA maduro.
***patch clamping* (parcheado de membranas):** técnica usada para medir el movimiento de iones a través de canales individuales, para lo cual se sitúa una micropipeta sobre la superficie de una célula.
pb: *véase par de bases.*
PC: *véase plastocianina.*
PCR: *véase reacción en cadena de la polimerasa.*
PDGF: *véase factor de crecimiento derivado de plaquetas.*
pectina: polisacáridos ramificados ricos en ácido galacturónico y ramnosa, presentes en las paredes de células vegetales, donde forman una matriz en la que se incluyen las microfibrillas de celulosa.
***pellet* (precipitado):** material que sedimenta en el fondo de un tubo de centrífuga, durante la centrifugación.
peptidil transferasa: actividad enzimática característica del rRNA de la subunidad grande del ribosoma, que cataliza la formación del enlace peptídico, en la síntesis de proteínas.
periodo refractario absoluto: tiempo breve durante el cual los canales de sodio de una neurona están inactivados y no pueden abrirse por despolarización.
periodo refractario relativo: período de tiempo durante la fase de hiperpolarización de un potencial de acción, durante el cual los canales de sodio de una célula nerviosa pueden reabrirse, pero es muy improbable que se dispare un potencial de acción, debido al predominio de las corrientes de K^+ sobre las de Na^+.

peroxisoma: orgánulo rodeado de una membrana sencilla, que contiene catalasa y una o más oxidasas que generan peróxido de hidrógeno, por lo que están implicados en el metabolismo de dicho oxidante.

peroxisoma foliar: tipo especial de peroxisoma, característico de las hojas de las plantas fotosintéticas, que contiene algunas de las enzimas de la fotorespiración.

PFK-2: *véase* f*osfofructoquinasa-2.*

PI 3-quinasa (PI3K): enzima que añade un grupo fosfato al PIP_2 (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato), convirtiéndolo en PIP_3 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato); componente clave de la ruta de la PI3K-Akt, que se activa como respuesta a la unión de ciertos factores de crecimiento a sus receptores.

PI3K: *véase PI 3-quinasa.*

pigmento: molécula que absorbe luz, dando color a una sustancia.

pigmento antena: molécula de un fotosistema con capacidad de absorber fotones y que cede la energía ganada a una clorofila u otro pigmento próximo, por transferencia de energía resonante.

pigmentos accesorios: moléculas tales como los carotenoides y las ficobilinas, que aumentan la capacidad de captación de luz en tejidos fotosintéticos, absorbiendo luz de longitud de onda distinta de la característica de las clorofilas; son responsables de las diferentes coloraciones de las plantas.

pila de Golgi (dictiosoma): es el conjunto de una serie de cisternas aplanadas, que se apilan una encima de otra, formando cada una de las unidades del complejo de Golgi.

pilus: *véase pilus sexual.*

pilus sexual (plural, **pili**): proyección que parte de la superficie de una bacteria donadora y llega a la superficie de una bacteria receptora, formando un puente citoplásmico transitorio de acoplamiento, a través del cual se transfiere el DNA durante la conjugación bacteriana.

pinzas ópticas: técnica en la que un haz de luz láser, enfocado a través del lente objetivo de un microscopio, atrapa una minúscula esfera de plástico, que se usa para manipular moléculas previamente unidas a dicha esfera.

pirimidina: molécula nitrogenada de un anillo aromático; esqueleto de las bases citosina, timina y uracilo.

PKA: *véase proteína quinasa A.*

PKC: *véase proteína quinasa C.*

placa: capa densa de material fibroso, localizada en la cara citoplásmica de las uniones adhesivas, como los desmosomas, hemidesmosomas y uniones adherentes; formada por proteínas intracelulares de anclaje, que hacen de puente entre la unión y los filamentos del citoesqueleto apropiados. El mismo término hace referencia a los puntos que aparecen en un cultivo de bacterias, cuando éstas son destruidas por un bacteriófago.

placa celular: saco aplanado característico de la pared vegetal en formación, que permite la separación de los núcleos hijos formados tras la división de una célula vegetal.

plaquina: familia de proteínas implicadas en la unión de las integrinas de un hemidesmosoma a los filamentos intermedios del citoesqueleto.

plásmido: pequeña molécula de DNA circular de bacterias, que se puede replicar independientemente del DNA del cromosoma; útil como de vector de clonación.

plásmido Ti: molécula de DNA bacteriano, que cuando se transfiere a vegetales, causa el tumor (agalla) de la corona; se utiliza como vector de clonación para introducir genes exógenos en células vegetales.

plasmodesmo: canal citoplásmico que atraviesa las paredes de dos células vegetales adyacentes, permitiendo la fusión de las membranas plasmáticas y la comunicación entre las células.

plasmolisis: salida de agua que hace que la membrana plasmática tire de la pared celular, en las células vegetales que han sido expuestas a una solución hipertónica.

plastidio: uno de los tipos de orgánulos vegetales, derivado de proplastidios, que incluye a los cloroplastos, amiloplastos, cromoplastos, proteínoplastos y elaioplastos.

plastocianina (PC): cupro-proteína que cede electrones a la clorofila P700 del fotosistema I, durante la fase lumínica de la fotosíntesis.

plastoquinol: forma totalmente reducida de la plastoquinona, implicada en la fase lumínica de la fotosíntesis; presente en la fase lipídica de las membranas fotosintéticas, donde transfiere los electrones al complejo del citocromo b_6/f.

plastoquinona: molécula no proteica (quinona), asociada con el fotosistema II, donde recibe los electrones de una clorofila modificada, denominada feofitina, durante la frase lumínica de la fotosíntesis.

pletina: plataforma del microscopio en la que se dispone la muestra.

pmf: *véase fuerza protón-motriz.*

poder de resolución: capacidad de un microscopio para distinguir objetos próximos como entidades independientes.

polaridad: molécula que tiene una parte cargada positivamente y otra negativamente, debido a que una región de la molécula suele poseer uno o más átomos electronegativos, que atraen a los electrones a esas áreas.

polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP): diferencias en los mapas de restricción entre individuos, causadas por ligeras variaciones en la secuencia de bases de su DNA.

polimorfismo simple de nucleótidos (SNPs): variaciones en la secuencia de bases del DNA entre individuos de la misma especie.

polinucleótido: cadena lineal de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster.

polipéptido: cadena lineal de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos.

polirribosoma: grupo de dos o más ribosomas traduciendo simultáneamente una misma molécula de mRNA.

polisacárido: polímero formado por azúcares, o sus derivados, unidos entre sí por enlaces glicosídicos.

porina: proteína transmembrana que forma poros, para la difusión facilitada de pequeñas moléculas hidrófilas; está presente en las membranas externas de mitocondrias, cloroplastos y muchas bacterias.

poro nuclear: pequeña abertura en la envuelta nuclear, a través de la cual entran y salen moléculas; limitado por una complicada estructura proteica, denominada complejo del poro nuclear (NPC).

potencial de acción: breve cambio en el potencial de membrana, consistente en una despolarización inicial seguida de una rápida vuelta al potencial de reposo; causado por la entrada de Na^+ y subsiguiente salida de K^+; permite la transmisión del impulso nervioso.

potencial de equilibrio de membrana: potencial de membrana que anula el efecto del gradiente de concentración de un determinado ion.

potencial de membrana: voltaje a través de una membrana, creado por un gradiente de iones; generalmente el interior de la célula tiene carga negativa en relación al exterior.

potential de reducción standar (E_0'): convención usada para cuantificar el potencial de óxido-reducción del transporte de electrones, en relación al par redox H^+/H_2, al que se le asigna un valor E_o' de 0,0 V a pH 7,0.

potencial de reposo de una membrana (V_m): potencial (voltaje) eléctrico a través de la membrana plasmática de una célula nerviosa no estimulada.

potencial electroquímico: gradiente transmembrana de un ion, con un componente eléctrico -debido a la separación de cargas a ambos lados de la membrana- y un componente de concentración; se denomina también gradiente electroquímico.

potencial postsináptico excitador (EPSP): pequeña despolarización de la membrana postsináptica, desencadenada por la unión de un neurotransmisor excitador a su receptor; si el EPSP supera un umbral puede conducir a la generación de un potencial de acción. *Véase también* potencial *postsináptico inhibidor.*

potencial postsináptico inhibidor (IPSP): pequeña hiperpolarización de la membrana postsináptica, resultante de la unión de un neurotransmisor inhibidor a sus receptores; contrarresta la amplitudud de subsiguientes potenciales postsinápticos excitadores, pudiendo impedirse la descarga de un potencial de acción. *Véase también potencial postsináptico excitador).*

potencial umbral: valor del potencial de membrana que tiene que ser alcanzado, antes de que se dispare un potencial de acción.

potencial (voltaje): tendencia a la atracción entre cargas iónicas opuestas.

precarcinógeno: sustancia capaz de producir cáncer, si ha sido metabólicamente activada por enzimas del hígado.

pre-mRNA: transcrito primario, cuyo procesamiento da lugar al mRNA maduro.

pre-rRNA: transcrito primario, cuyo procesamiento da lugar a los rRNAs maduros.

presión de turgor: presión que se genera en una célula como resultado de la entrada de agua, debido a una mayor concentración de soluto dentro de la célula que en el exterior; responsable de la firmeza o turgencia de las células correctamente hidratadas de los vegetales y otros organismos.

pre-tRNA: transcrito primario, cuyo procesamiento da lugar al tRNA maduro.

primasa: enzima que usa una hebra sencilla de DNA como molde, para guiar la síntesis de los cebadores de RNA, que se requieren para la iniciación de la replicación de las cadenas retrasada y conductora, de un DNA de doble hélice.

primer principio de la termodinámica: ley de la conservación de la energía; establece que la energía se puede convertir de una forma en otra, pero que no puede ni crearse y destruirse.

primosoma: complejo de proteínas de células bacterianas, que incluye a la primasa y otras seis

proteínas implicadas en el desenrollamiento del DNA y el reconocimiento de las secuencias de bases del lugar donde debe iniciarse la replicación.
prión: partícula proteica infecciosa, responsable de alteraciones neurológicas como el *scrapie* del ganado ovino, el *kuru* en el hombre, y la enfermedad de las vacas locas del ganado vacuno y su correspondiente forma humana, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD).
procariota: organismo caracterizado por la ausencia de un núcleo auténtico y de orgánulos de membrana; incluye a las eubacterias y las arqueas.
procaspasa: forma precursora inactiva de una caspasa.
procesamiento alternativo (ayuste) del mRNA: fusión de diferentes combinaciones de intrones y exones en el pre-mRNA, para producir RNAs mensajeros que difieren en la composición de exones, dando así lugar a la codificación de más de un tipo de polipéptido por un mismo gen.
procolágeno: molécula precursora que se convierte colágeno, tras el corte proteolítico de secuencias en los extremos N- y C-terminal.
profase: fase inicial de la mitosis, caracterizada por la condensación de los cromosomas y el inicio de la formación del huso acromático. La profase I de la meiosis es más compleja y se subdivide en cinco etapas denominadas leptotene, zigotene, paquitene, diplotene y diacinesis.
progresión: *véase progresión tumoral.*
progresión tumoral: cambio gradual observado en las propiedades de un tumor, que adquieren características más aberrantes y se hacen más agresivas.
prometafase: etapa de la mitosis caracterizada por la fragmentación de la envuelta nuclear y la unión de los cromosomas a los microtúbulos del huso; se denomina también profase tardía.
promoción (etapa de la carcinogenésis): proceso gradual por el que las células previamente expuestas a un carcinógeno, se convierten en células cancerosas, por activación de la proliferación celular.
promotor (sitio): secuencia de bases del DNA a la que se une la RNA polimerasa, para iniciar la transcripción.
propagación: desplazamiento del potencial de acción a lo largo de una membrana.
propagación pasiva de la despolarización: proceso por el cual los cationes (principalmente K^+) se desplazan desde el lugar de la despolarización de la membrana, hacia regiones en las cuales el potencial es más negativo.
proplastidio: orgánulo pequeño de doble membrana del citoplasma de células vegetales, que puede evolucionar hacia las diferentes clases de plastidios, entre los que se encuentran los cloroplastos
proteasoma: complejo multiproteico que cataliza la degradación, dependiente de ATP, de proteínas unidas a ubicuitina.
proteína: macromolécula consistente en uno o más péptidos, plegados en una conformación especificada por la secuencia lineal de aminoácidos. Juegan importantes papeles como enzimas, proteínas estructurales, proteínas motoras y proteínas de regulación.
proteína activadora (transcripción): proteína reguladora cuya unión al DNA conduce a un incremento en la tasa de transcripción de determinados genes próximos.
proteína activadora de GTPasa (GAP): proteína que acelera la inactivación de Ras, facilitando la hidrólisis del GTP asociado.
proteína adaptadora (PA): proteína que aparece en vesículas cubiertas de clatrina.
proteína bloqueante («capping»): proteína que se une al extremo de un microfilamento de actina, previniendo así la adición o pérdida de subunidades.
proteína central: molécula proteica a la que se unen múltiples glicosaminoglicanos, para formar un proteoglicano.
proteína de amarre (*tethering*): proteína superenrollada o complejo multimérico, que reconoce y une vesículas con sus membranas de destino.
proteína de transporte: proteína de membrana que reconoce sustancias con gran especificidad y que asiste a su movimiento a través de una membrana; incluye a proteínas transportadoras y a canales proteicos.
proteína de transporte de resistencia a multidrogas (MDR): ATPasa de tipo ABC, que usa la energía de la hidrólisis del ATP para bombear drogas hidrófobas fuera de la célula.
proteína de unión a DNA monocatenario (SSB): proteína que se une a las hebras sencillas del DNA de la horquilla de replicación, para mantenerlo desenrollado y accesible a la maquinaria de replicación.
proteína de unión a TATA (TBP): componente del factor de transcripción TFIID, al que confiere la capacidad de reconocer y unirse a la caja TATA del DNA; está también implicada en la regulación del inicio de la transcripción, en aquellos promotores que carecen de una caja TATA.
proteína disulfuro isomerasa: enzima de la luz del RE, que cataliza la formación y ruptura de puentes disulfuro entre los residuos de cisteína de cadenas polípeptídicas.
proteína ferrosulfurosa (Fe-S): proteína que tienen átomos que hierro y azufre, formando un complejo con cuatro residuos de cisteína; funciona como transportador en el sistema transportador de electrones.
proteína fibrilar: proteína rica en hélices α o estructuras laminares β, que le confieren una estructura repetitiva altamente ordenada.
proteína fosfatasa: una de las numerosas enzimas que cataliza la defosforilación, o eliminación por hidrólisis, de grupos fosfato de múltiples proteínas diana.
proteína G: una de las numerosas proteínas de regulación que unen GTP, localizadas en la membrana plasmática y que intervienen en rutas de transducción de señales, que generalmente activan a una proteína diana, como una enzima o un canal proteico.
proteína globular: proteína cuyas cadenas polípeptídicas están replegadas en estructuras compactas, en lugar de filamentos extendidos.
proteína integral de membrana: proteína hidrófoba localizada en el interior de una membrana, pero que tiene también regiones hidrófilas que asoman hacia una o las dos superficies de dicha membrana.
proteína integral monotópica: proteína integral de membrana insertada en tan solo una de las monocapas.
proteína intercabiadora de aniones: proteína de antiporte que permite el intercambio recíproco de iones cloruro y bicarbonato, a través de la membrana plasmática.
proteína intercambiadora de fosfolípidos: proteína del citosol que transfiere fosfolípidos desde la membrana del ER hasta la membrana externa de mitocondrias y cloroplastos y a la membrana plasmática.
proteína monomérica: proteína formada por una única cadena polipeptídica.
proteína motora (mecanoenzima): proteína que emplea la energía derivada del ATP para cambiar la forma, de manera que se ejerzan fuerzas que produzcan el movimiento de estructuras que están ancladas; incluye a tres familias de proteínas (miosinas, dineínas, y quinesinas), que interaccionan con elementos del citoesqueleto (microtúbulos y microfilamentos).
proteína multimérica: proteína formada por dos o más cadenas polípeptídicas.
proteína periférica de membrana: proteína hidrófila que se une a la superficie de la membrana, por medio de interacciones iónicas débiles y puentes de hidrógeno.
proteína quinasa A (PKA): proteína quinasa activada por el segundo mensajero AMP cíclico, que cataliza la fosforilación de residuos de serina o treonina en proteínas diana.
proteína quinasa activada por mitógenos (MAP quinasa o MAPK): familia de proteína quinasas que se activan cuando las células reciben señales de crecimiento y división.
proteína quinasa C (PKC): enzima que fosforila residuos de serina y treonina en una gran variedad de proteínas diana, cuando es activada por el diacilglicerol.
proteína quinasa no receptora: cualquier proteína quinasa que no está integrada en un receptor de la superficie celular.
proteína receptora de cAMP (CRP): proteína bacteriana que liga cAMP, activando la transcripción de genes reprimibles de enzimas catabólicas.
proteína represora (de eucariotas): factor de transcripción regulador, cuya unión al DNA produce un descenso en la tasa de transcripción de los genes próximos.
proteína represora (de procariotas): proteína que se une al operador de un operón, bloqueando la transcripción de los genes adyacentes.
proteína soluble de unión a NSF (SNAP): proteína citoplásmica soluble que actúa conjuntamente con NSF (factor sensible a N-ethylmaleimida) para mediar en la fusión de membranas reunidas por interacciones entre v-SNAREs y t-SNAREs.
proteína transmembrana: proteína integral que posee una o más regiones hidrófobas que se expanden por la membrana y una o más regiones hidrófilas que asoman a ambos lados de la membrana.
proteína transportadora: proteína de membrana que transporta solutos uniéndose a estos a un lado de la membrana y sufriendo luego un cambio conformacional, que transfiere al soluto al otro lado de la membrana.
proteínas asociadas a microtúbulos (MAP): cualquiera de las proteínas accesorias que se unen a los microtúbulos, y modulan su ensamblaje, estructura o función.

proteínas de membrana ancladas a ácidos grasos: proteínas localizadas en la superficie de la membrana, que se unen covalentemente a ácidos grasos de la bicapa lipídica.
proteínas de membrana ancladas a lípidos: proteínas localizadas en la superficie de la membrana, unidas covalentemente a una o más moléculas de la bicapa lipídica. *Véase también proteínas de membrana ancladas ácidos grasos*, *proteínas de membrana preniladas* y *proteínas de membrana ancladas por puentes GPI.*
proteínas de membrana ancladas por puentes GPI: proteínas que se unen a moléculas de glicosilfosfatidilinositol (GPI), glicolípido propio de la monocapa externa de la membrana plasmática.
proteínas de membrana preniladas: proteínas localizadas en la superficie de la membrana, que se unen covalentemente a grupos prenilo de la bicapa lipídica.
proteínas HMG: *véase grupo de proteínas de alta movilidad.*
proteínas motoras asociadas a microtúbulos: *véase motores MAP*.
proteínas que ligan actina: proteínas que se unen a los microfilamentos de actina, regulando su longitud o ensamblaje, o sirviendo de puente entre ellos y otras estructuras de la célula, como la membrana plasmática.
proteoglicano: complejo formado por proteínas y glicosaminoglicanos, propios de la matriz extracelular.
proteolisis: degradación de proteínas por hidrólisis de los enlaces peptídicos entre aminoácidos.
proteolítico, corte: eliminación de una parte de un polipéptido, o corte de un polipéptido en dos fragmentos, por una enzima que hidroliza los enlaces peptídicos.
proteoma: estructura y propiedades de todas las proteínas que produce un genoma.
protoeucariota: ancestro hipotético de las células eucariotas actuales, cuya capacidad de fagocitar le permitió englobar y establecer relaciones simbióticas con las primitivas bacterias.
protofilamento: polímero lineal de subunidades de tubulina; se suele organizar en grupos de 13, para formar la pared de un microtúbulo.
proto-oncogen: gen normal que puede convertirse en un oncogén, por una mutación puntual, amplificación génica, translocación cromosómica, reordenamiento local del DNA o mutagénesis por inserción.
provacuola: vesícula de células vegetales comparable al endosoma de células animales; se forma por el complejo de Golgi o por autofagia.
proyección de Fischer: modelo que representa la estructura química de una molécula como una cadena dibujada verticalmente, donde el átomo más oxidado aparece arriba y las proyecciones horizontales corresponden a elementos que salen del plano del papel.
proyección de Haworth: modelo que muestra la estructura química de la molécula haciendo hincapié en la relación espacial de sus diferentes partes.
prueba *cis-trans*: análisis para determinar si una mutación en un operón bacteriano, afecta a la proteína de regulación o a la secuencia del DNA, a la cual se une.
pseudópodo: gran expansión citoplásmica implicada en el movimiento de amebas, plasmodios y leucocitos.
PSI: *véase fotosistema I.*
PSII: *véase fotosistema II.*
PTEN: fosfatasa que elimina un grupo fosfato del PIP_3 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato), convirtiéndolo en PIP_2 (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato); componente de la ruta PI3K-Akt .
puente de conjugación: conexión citoplásmica transitoria a través de la cual se transfiere el DNA desde una bacteria macho a otra hembra, durante la conjugación.
puente de hidrógeno: fuerza de atracción débil entre un átomo electronegativo y un átomo de hidrógeno, que está unido covalentemente a un segundo átomo electronegativo.
puente disulfuro: enlace covalente entre dos átomos de azufre, tras la oxidación de grupos sulfhidrilo. Los puentes disulfuro formados entre dos cisteínas intervienen en la estabilización de la estructura terciaria de las proteínas.
puentes de miosina: estructura formada durante el contacto entre las cabezas de los filamentos gruesos y los filamentos finos de las miofibrillas musculares.
puma: proteína que activa la apoptosis uniéndose e inactivando a la proteína antiapoptótica Bcl-2.
punto de control: ruta que comprueba en qué condiciones se encuentra la célula, parando transitoriamente el ciclo celular, si éstas no son las adecuadas.
punto de control de daños en el DNA: mecanismo que detecta daños en el DNA, deteniendo en tal caso el ciclo celular en diferentes fases, como G1 tardía, S y G2 tardía.
punto de control de la replicación del DNA: mecanismo que comprueba el estado de replicación del DNA, para asegurar que ésta se ha completado, antes de permitir que la célula salga de G2 y entre en mitosis.
punto de control del huso mitótico: mecanismo que detiene la mitosis entre metafase y anafase, si los cromosomas no se han unido al huso de forma apropiada. (p. 594)
punto de restricción: punto de control cerca del final de la fase G1, en el que el ciclo celular puede detenerse hasta que las condiciones sean las favorables para la progresión hacia la fase S; está regulado en buena medida, por la presencia o ausencia de factores de crecimiento extracelulares; en levaduras, se denomina *Start.*
purina: molécula nitrogenada de dos anillos aromáticos; esqueleto de las bases adenina y guanina.

Q

quantum (cuanto): paquete indivisible de energía de un fotón de luz.
quiasma: conexión entre cromosomas homólogos, producida por el sobrecruzacimiento durante la profase I de la meiosis.
química orgánica: química de los compuestos que contienen carbono.
quimiotaxia: movimiento celular de aproximación o retirada, respectivamente, hacia un atrayente o un repelente químico.
quimiotrofo: organismo que depende de la energía contenida en los enlaces químicos de moléculas tales como carbohidratos, lípidos y proteínas.
quinasa de cadenas ligeras de miosina (MLCK): enzima que fosforila a las cadenas ligeras de miosina, desencadenando la contracción del músculo liso.
quinasa dependiente de ciclina (Cdk): cualquiera de las quinasas de proteínas activadas por las ciclinas que controlan la progresión del ciclo celular de eucariotas, fosforilando varias proteínas diana.
quinasa Janus (Jak): proteína quinasa del citoplasma que, cuando se activa por receptores de la superficie celular, cataliza la fosforilación y activación de los factores de transcripción STAT.
quinesina: familia de proteínas motoras responsables de movimientos asociados a microtúbulos, dependientes de la energía derivada de la hidrólisis del ATP.
quinesinas, familia (KIF): cada una de las muchas proteínas que tienen un dominio motor semejante al de la quinesina, que pueden aparecer en áreas muy diferentes de diferentes moléculas.
quitina: polisacárido estructural del exoesqueleto de insectos y crustáceos, formado por unidades de *N*-acetilglucosamina con enlaces $\beta(1 \rightarrow 4)$.

R

Rac: miembro de la familia de las proteínas G monoméricas, entre las que están también incluidas Rho y Cdc42, que estimula la formación de varias estructuras celulares, que contienen actina.
radiación ionizante: radiación de alta energía que arranca electrones de las moléculas, generando iones muy reactivos, que causan daños en el DNA; entre ellos están los rayos X y las radiaciones emitidas por los elementos radiactivos.
radiación ultravioleta (UV): radiación mutagénica presente en la luz solar, que produce la formación de dímeros de pirimidinas en el DNA.
Ras, proteína: proteína G monomérica, unida a la cara interna de la membrana plasmática, que funciona como intermediario en la transmisión de señales, desde los receptores tirosina quinasa, hacia el interior celular.
***RB*, gen:** gen supresor de tumores que codifica la proteína Rb.
Rb, proteína: proteína cuya fosforilación controla la progresión a través del punto de restricción del ciclo celular.
RCG: *véase red cis-Golgi.*
RE: *véase retículo endoplásmico.*
RE liso: *véase retículo endoplásmico liso.*
RE rugoso: *véase retículo endoplásmico rugoso.*
reacción de condensación: reacción química resultante de unir dos moléculas, con liberación de una molécula de agua.
reacción de transferencia de grupo: reacción química consistente en la cesión de un grupo químico, desde una molécula a otra.
reacción en cadena de la polimerasa (PCR): reacción que amplifica un segmento específico de DNA, en ciclos repetidos de (1) tratamiento térmico para separar las dos cadenas de la doble hélice, (2) incubación con cebadores (*primers*), complementarios de las secuencias localizadas en los dos extremos del segmento de DNA a amplificar y (3) incubación con la DNA polimerasa, para sintetizar el DNA usando los cebadores como puntos de partida.
reacciones de asimilación de carbono: parte de la ruta fotosintética en la cual los átomos de

carbono completamente oxidados del CO_2, son fijados (unidos covalentemente) a aceptores orgánicos, siendo reducidos y reorganizados para formar carbohidratos y otras moléculas orgánicas necesarias para constituir una célula.

reacciones de transducción de energía: parte de la fotosíntesis en la que la energía de la luz se convierte en energía química, en forma de ATP y de la coenzima NADPH, que a su vez proveen de energía y poder de reducción para las reacciones de asimilación del carbono.

receptor: proteína que tiene un lugar para la unión de una molécula de señalización específica.

receptor canónico: el receptor específico de un ligando dado.

receptor de LDL: proteína de la membrana plasmática que sirve como receptor para la unión de las LDL extracelulares, que son así tomadas por endocitosis mediada por receptores.

receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR): proteína de la membrana plasmática a la que se une el factor de crecimiento fibroblástico, activandose su capacidad tirosina quinasa y desencadenando una serie de eventos de señalización en el interior de la célula, que pueden conducir al crecimiento celular, proliferación y diferenciación.

receptor nuclear: proteína nuclear que funciona como factor de transcripción, una vez que se ha unido a ella una molécula de señalización; generalmente, aunque no siempre, es una hormona esteroídica.

receptor serina/treonina quinasa: receptor que, tras activación, cataliza la fosforilación de residuos de serina y treonina de proteínas diana.

receptor tirosina quinasa: receptor que cuando está activo cataliza la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, desencadenando una cadena de eventos de señalización, que culminan con el crecimiento de la célula, la proliferación y la diferenciación.

recombinación homóloga: intercambio de información genética entre dos moléculas de DNA, que presentan una gran similitud de secuencia; se emplea también en la reparación de las rupturas de doble cadena del DNA.

recubrimiento por bombardeo (*sputter*): proceso de recubrimiento de una muestra con una capa de oro u oro/paladio, evaporado al vacío y que permite la observación del material en el microscopio electrónico de barrido

recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueado: técnica para medir la tasa de difusión lateral de lípidos y proteínas de membrana, cuyas moléculas se han unido a un colorante fluorescente, antes de que se blanquee una pequeña región de la membrana, con un haz de luz laser.

red *cis*-Golgi (RCG): región del complejo de Golgi constituída por una red de túbulos de membrana, dispuestos junto a los elementos de transición.

red terminal: malla densa de moléculas de espectrina y miosina, localizada en la base de una microvellosidad, a la cual se anclan los microfilamentos de actina que constituyen el eje de dicha microvellosidad.

red *trans*-Golgi (TGN): región del complejo de Golgi formada por una red de túbulos localizados al lado opuesto de la red *cis*-Golgi.

reducción: reacción química que implica la ganancia de electrones; en la reducción de moléculas orgánicas, generalmente se añaden, tanto electrones, como iones de hidrógeno (protones), por lo que también se llama reacción de hidrogenación.

reducción fotoquímica: transferencia de electrones fotoexcitados desde una molécula a otra.

región de organización nucleolar (NOR): región del DNA de ciertos cromosomas, donde se localizan múltiples copias de los genes que codifican el RNA ribosomal y donde se forman los nucleolos.

región de unión al DNA: región de un factor de transcripción, que reconoce y se une a una secuencia determinada de bases.

regulación en el nivel del sustrato: regulación enzimática que depende directamente de las interacciones de los sustratos y los productos con la enzima.

regulador de la conductancia trasmembrana en la fibrosis cística (CFTR): proteína de membrana que funciona como un canal de cloruro y cuya forma mutada puede dar origen a la fibrosis cística.

relación área/volumen: relación matemática entre la superficie de una célula y su volumen; disminuye conforme la célula aumenta linealmente (longitud o radio), poniendo en compromiso el mantenimiento de la superficie apropiada para importar nutrientes y exportar productos de desecho, cuando la célula incrementa su tamaño.

relación simbiótica: asociación mutua beneficiosa entre células (u organismos) de dos especies diferentes.

remodelación de cromatina: modificación en la estructura, empaquetamiento o disposición de los nucleomas, que facilita el acceso de los factores de transcripción al DNA, en las regiones promotoras de un gen.

renaturalización: vuelta de una proteína desnaturalizada a la conformación nativa, determinada por su secuencia aminoacílica; generalmente viene acompañada de la recuperación funcional.

renaturalización del DNA: reunión de las dos hebras de un DNA de doble cadena, impulsada por la complementariedad de bases; regenera la doble hélice.

reordenamiento del DNA: movimiento de segmentos de DNA de un lugar a otro del genoma.

reparación de apareamientos erróneos: mecanismo de reparación del DNA , que detecta y corrige pares de bases que han formado puentes de hidrógeno incorrectos.

reparación de bases por excisión: mecanismo de reparación del DNA que quita y reemplaza bases dañadas.

reparación por escisión de nucleótidos (NER): mecanismo de reparación del DNA, que reconoce y repara daños en la doble hélice, del tipo de los causados por los dímeros de pirimidina.

reparación por escisión: mecanismo de reparación del DNA, que elimina y reemplaza los nucleótidos anormales.

repetición invertida: segmentos de DNA que contienen dos copias de la misma secuencia de bases, orientadas en sentidos opuestos.

repeticiones en tandem de número variable (VNTR): secuencias cortas y repetitivas de DNA, cuyas variaciones en longitud entre individuos son la base de la «huella dactilar» de la prueba del DNA.

replicación semiconservativa: forma de replicación del DNA en la cual cada molécula recién formada porta una hebra antigua y otra nueva.

replicón: longitud total del DNA replicado desde un único origen de replicación.

replicosoma: gran complejo proteico que lleva a cabo la replicación del DNA en la orquilla de replicación; tiene aproximadamente el tamaño de un ribosoma.

represión de catabolitos: capacidad de la glucosa para inhibir la síntesis de las enzimas catabólicas producidas por operones bacterianos inducibles.

represión por producto final: regulación de una ruta anabólica, basada en la capacidad que tiene el producto final, de reprimir la síntesis de las enzimas implicadas en su propia producción.

represor de la traducción: proteína reguladora que inhibe selectivamente la traducción de un mRNA concreto.

reproducción asexual: forma de reproducción en la cual un único parental aporta la información genética del nuevo individuo.

reproducción sexual: forma de reproducción en la cual dos organismos parentales ceden información genética al nuevo organismo; reproducción por fusión de gametos.

repulsión de cargas: fuerza de repulsión que separa dos iones, moléculas completas o regiones de éstas, que presentan cargas eléctricas del mismo signo .

resolución: distancia mínima entre dos puntos, cuya imagen sigue siendo identificable como dos puntos, cuando se ven a través de un microscopio.

respiración aeróbica: proceso exergónico por el cual la célula oxida glucosa, rindiendo dióxido de carbono y agua y utilizando al oxígeno como último aceptor de electrones; una parte significativa de la energía liberada se conserva en forma de ATP.

respiración anaeróbica: respiración celular en la que el último aceptor de electrones no es el oxígeno.

respiración celular: oxidación en la que los electrones fluyen desde coenzimas reducidas hasta un aceptor de electrones; generalmente va acompañada de la producción de ATP.

retículo endoplásmico (RE): red interconectada de membranas, distribuida por todo el citoplasma, que interviene en la síntesis, procesamiento y transporte de proteínas, en las células eucariotas.

retículo endoplásmico liso (RE liso): retículo endoplásmico que no tiene ribosomas asociados, ni interviene directamente en la síntesis de proteínas; implicado en el empaquetamiento de proteínas de secreción y en la síntesis de lípidos.

retículo endoplásmico rugoso (RE rugoso): retículo endoplásmico que está salpicado de ribosomas en su cara citosólica, lo que le faculta para realizar la síntesis de proteínas.

retículo sarcoplásmico (SR): retículo endoplásmico de una célula muscular, especializado en el almacenamiento y liberación de iones calcio.

retrocruzamiento: procedimiento experimental de cría, en el cual un individuo heterocigoto se cruza con uno de los homocigotos parentales.

retrotrasposón: tipo de trasposón que se mueve de un lugar a otro de un cromosoma, en un proceso en el cual el DNA del retrotrasposón se transcribe primero a RNA y posteriormente una transcriptasa inversa usa al RNA como molde, para hacer una copia del DNA, que se integrará en un lugar diferente del cromosoma.

retrovirus: cualquier virus RNA que se vale de la transcriptasa inversa hacer una copia de DNA a partir de su RNA.

RFLP: *véase polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción.*

Rho: miembro de una familia de proteínas G monoméricas, que incluye también a Rac y Cdc42, que estimula la formación de diferentes estructuras celulares, que contienen actina.

ribointerruptor (*riboswitch*): lugar del mRNA al cual se une una pequeña molécula, que desencadena un cambio en la conformación del mRNA, que puede alterar, tanto la transcripción, como la traducción.

ribosa: azúcar de cinco carbonos presente en el RNA y en los nucleótidos trifosfato, como el ATP y GTP.

ribosoma: partícula pequeña de rRNA y proteínas, que sirve como lugar de la síntesis de proteínas, en el citoplasma de procariotas y en el citoplasma, mitocondrias y cloroplastos de eucariotas; está formado por una subunidad grande y otra pequeña.

ribozima: molécula de RNA con actividad catalítica.

ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (rubisco): enzima que cataliza la etapa de captura del CO_2 del ciclo de Calvin; une el CO_2 a la ribulosa-1,5-bifosfato, formando dos moléculas de 3-fosfoglicerato.

RISC: complejo en el que un siRNA y varias proteínas, silencian la expresión de los mRNAs o los genes que contienen las secuencias complementarias a las del siRNA; abreviatura de complejo inductor de silenciamiento del RNA (en inglés, *RNA-induced silencing complex*).

RNA (ácido ribonucleico): ácido nucleico que interviene, de diferentes maneras, en la expresión de la información genética; formado por nucleótidos, consistentes en una ribosa fosfato unida a adenina, uracilo, citosina o guanina. *Véase también RNA mensajero; RNA ribosómico; RNA de transferencia.*

RNA cebador (*primer*): fragmento corto de RNA, sintetizado por la DNA primasa, que sirve como lugar de iniciación para la síntesis del DNA.

RNA de interferencia: *véase siRNA.*

RNA de transferencia (tRNA): familia de moléculas pequeñas de RNA; cada una de ellas se une a un aminoácido determinado y posee un anticodón que reconoce a un codón específico del mRNA.

RNA interferencial: capacidad de las moléculas cortas de RNA (siRNAs or microRNAs) de inhibir la expresión génica, activando la degradación del mRNA, inhibiendo su traducción o inhibiendo la transcripción del gen que codifica un mRNA determinado.

RNA mensajero (mRNA): molécula de RNA que contiene la información que especifica la secuencia de aminoácidos de uno o más polipéptidos.

RNA polimerasa: una de las enzimas que cataliza la síntesis de RNA, usando el DNA como molde; opera añadiendo sucesivamente nucleótidos al extremo de una hebra creciente de RNA.

RNA polimerasa I: tipo de RNA polimerasa de eucariotas presente en el nucleolo, que sintetiza el RNA precursor de tres de los cuatro tipos de RNA.

RNA polimerasa II: tipo de RNA polimerasa de eucariotas presente en el nucleoplasma, que sintetiza pre-mRNA y la mayoría de los snRNAs

RNA polimerasa III: tipo de RNA polimerasa de eucariotas presente en el nucleoplasma, que sintetiza diversos RNAs pequeños, incluyendo los pre-tRNAs y el rRNA 5S.

RNA ribosómico (rRNA): molécula de RNA empleada en la construcción de los ribosomas.

RNA, procesamiento del: conversión de un transcrito inicial de RNA en el producto final maduro, quitando, añadiendo o modificando químicamente ciertos nucleótidos.

rotación (de moléculas lipídicas): giro de una molécula alrededor de su eje longitudinal; ocurre libre y rápidamente en los fosfolípidos de membrana.

rRNA: *véase RNA ribosómico.*

rubisco activasa: proteína que estimula la fijación fotosintética del carbono, eliminando azúcares-fosfato que inhiben el sitio activo de la enzima rubisco.

rubisco: *véase ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa*

ruta anabólica: serie de reacciones conducentes a la síntesis de componentes celulares.

ruta anfibólica: serie de reacciones que funcionan en modo catabólico y que a la vez, dan lugar a precursores de rutas anabólicas.

ruta catabólica: serie de reacciones que conducen a la ruptura de componentes celulares.

ruta de Wnt: ruta de señalización que juega un papel prominente en el control de la proliferación celular y su diferenciación durante el desarrollo embrionario; en algunos tipos de cánceres se producen anomalías en esta ruta,.

ruta del glicolato: ruta dependiente de la luz, que disminuye la eficacia de la fotosíntesis, oxidando compuestos de carbono reducidos, sin capturar la energía liberada; tiene lugar cuando el oxígeno sustituye al dióxido de carbono, en las reacciones catalizadas por la enzima rubisco, generando fosfoglicolato, que es convertido en 3-fosfoglicerato en los peroxisomas y mitocondrias; se denomina también fotorespiración.

ruta glucolítica: *véase glucolisis.*

ruta metabólica: serie de reacciones enzimáticas, que convierten una molécula en otra, a través de una serie de intermediarios.

S

***S*:** *véase entropía.*

S1: *véase subfragmento 1 de la miosina.*

sarcoma: cáncer derivado de una estructura de soporte, como el hueso, el cartílago, la grasa, el tejido conjuntivo y el músculo.

sarcómero: unidad contráctil fundamental de las miofibrillas del músculo estriado, que va de una línea Z a la siguiente y está formado por dos juegos de filamentos finos (actina) y un juego de filamentos gruesos (miosina).

SarI: proteína G pequeña coexistente con Sec13/31 y Sec23/24 en las cubiertas de las vesículas COPII de levaduras.

saturación: imposibilidad de aumentar la velocidad de una reacción enzimática por encima de un límite, pese a que se añada más sustrato; el límite viene determinado por el número finito de moléculas enzimáticas disponibles.

Sec13/31: complejo proteico de levaduras, que se encuentra junto con Sec23/24 y SarI en las vesículas con cubiertas COPII.

Sec23/24: complejo proteico de levaduras, que se encuentra junto con Sec13/31 ySarI en las vesículas con cubiertas COPII.

secreción constitutiva: fusión contínua con la membrana plasmática, de vesículas de secreción que liberan su contenido al exterior, sin que medien señales extracelulares específicas.

secreción polarizada: fusión de vesículas secretoras con una determinada región de la membrana plasmática, con la correspondiente expulsión de su contenido al exterior.

secreción regulada: fusión de vesículas de secreción con la membrana plasmática y expulsión de su contenido al exterior, en respuesta a señales extracelulares específicas.

secuencia de parada de transferencia: secuencia aminoacílica hidrófoba de un polipéptido naciente, que detiene su translocación a través de la membrana, facilitando su integración en ésta.

secuencia de transferencia: secuencia aminoacílica de un polipéptido naciente , que actúa como señal para dirigir al complejo ribosoma-mRNA-polipéptido hacia el ER y como punto de anclaje que permite la integración permanente del polipéptido en la bicapa lipídica.

secuencia de tránsito: secuencia aminoacílica que dirige a un polipéptido completo hacia la mitocondria o el cloroplasto.

secuencia señal del RE: secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica naciente, que dirige el complejo ribosoma-mRNA-polipéptido hacia la superficie del RE.

secuenciación del DNA: tecnología empleada para determinar la secuencia lineal de bases en moléculas o fragmentos de DNA.

segmento transmembrana: segmento hidrófobo de unos 20-30 aminoácidos de longitud, de una proteína transmembrana, que cruza la bicapa lipídica.

segunda ley de la termodinámica: ley de la espontaneidad termodinámica; principio que establece que todos los cambios físicos y químicos se producen de manera que aumenta la entropía del universo.

segundo mensajero: una de las sustancias que trasmiten señales desde ligandos extracelulares al interior de la célula, entre las que se encuentran el AMP cíclico, los iones de calcio, el inositol trifosfato y el diacilglicerol,.

selectina: glicoproteína de la membrana plasmática que interviene en las adhesiones célula a célula, basadas en la interacción con grupos hidrocarbonados específicos, localizados en la superficie de las células diana.

SEM: *véase microscopio electrónico de barrido.*

sensor de voltaje: segmento de aminoácidos de un canal iónico dependiente de voltaje, que hace que el canal puede responder a cambios en el potencial de membrana.

señal autocrina: factor de crecimiento u otra molécula que actúa sobre la propia célula que la ha segregado.
señal de exportación nuclear (NES): secuencia de aminoácidos que etiquetan a una proteína, para que sea exportada desde el núcleo
señal de localización nuclear (NLS): secuencia de aminoácidos que etiquetan a una proteína, para que sea importada por el núcleo.
señal de reconocimiento de la partícula (SRP): complejo RNA-proteína del citoplasma, que se une a la secuencia de señalización del RE localizada en extremo N-terminal de una cadena peptídica naciente y cuya función es la de dirigir al sistema ribosoma-mRNA-polipéptido hacia la superficie del RE.
señal de terminación: secuencia de DNA localizada junto al extremo de un gen, que activa el fin de la transcripción.
señal endocrina: hormona u otra molécula que se libera al sistema circulatorio, para que pueda actuar sobre células distantes.
señal paracrina: factor de crecimiento u otra molécula que actúa sobre células próximas.
señuelo de secuencias sin parada: mecanismo para la destrucción de mRNAs, basado en la ausencia de codones de parada.
señuelo de secuencias sin sentido: mecanismo para la destrucción de mRNAs, basado en la presencia de codones de parada prematuros.
silenciador: secuencia del DNA que porta un lugar de unión para los factores que inhiben la transcripción y cuya posición y orientación relativa al promotor puede variar significativamente, sin que ello interfiera con la capacidad de regular la transcripción.
simporte de Na^+/glucosa: proteína de membrana que introduce simultáneamente glucosa y iones sodio; estos últimos entran a favor de gradiente electroquímico, lo que permite el transporte de la glucosa en contra de su gradiente de concentración.
simporte: transporte acoplado de dos solutos a través de una membrana, en la misma dirección.
sinapsis: apareamiento estrecho entre cromosomas homólogos durante la fase de zigotene de la profase I de la meiosis.
sinapsis: pequeño espacio entre una neurona y otra célula (neurona, célula muscular o célula glandular), a través del cual se transfiere el impulso nervioso, bien por conexión eléctrica directa, bien por sustancias químicas llamadas neurotransmisores.
sinapsis colinérgica: sinapsis que emplea a la acetil colina como neurotransmisor.
sinapsis eléctrica: contacto entre dos células nerviosas, en el que los impulsos se transmiten por flujo directo de iones a través de uniones comunicantes (*gap*), sin la presencia de neurotransmisores.
sinapsis química: unión entre dos células nerviosas, donde el impulso nervioso se transmite por neurotransmisores que difunden desde la célula presináptica a la postsináptica, a través de la hendidura sináptica.
síntesis enzimática adaptativa: regulación de la concentración intracelular de una enzima, modulando su síntesis en respuesta a las necesidades celulares.
síntesis translesion: replicación del DNA en regiones en las cuales el molde de DNA está dañado.
siRNA: tipo de RNA de doble cadena, de unos 23 nucleótidos de longitud, que silencia la expresión génica; actúa, bien promoviendo la degradación de los mRNAs complementarios o bien inhibiendo la transcripción de los genes cuyas secuencias le son complementarias.
sistema: porción restringida de universo, que es objeto de estudio en un momento dado, cuando se investigan los principios que gobiernan la distribución de la energía.
sistema de endomembranas : Sistema interconectado de membranas de las celulas eucariotas, formado por el retículo endoplásmico, el complejo de Golgi , los endosomas, los lisosomas y la envuelta nuclear.
sistema de restricción/metilación: mecanismo de las células bacterianas que permite el corte, con enzimas de restricción, de DNA exógeno, quedando protegido el genoma de la bacteria, gracias a que previamente se ha metilado.
sistema de transporte de electrones: grupo de transportadores de electrones unidos a la membrana, que transfieren los electrones desde las coenzimas NADH y $FADH_2$, hasta el oxígeno.
sistema de túbulos transversales (túbulos T): invaginaciones de la membrana plasmática que penetran en el interior de una célula muscular y conducen impulsos eléctricos hacia el interior de la misma, donde los túbulos T están en contacto íntimo con el retículo sarcoplásmico, que libera los iones calcio.
sistema nervioso: grupo de células, tejidos y órganos que recogen y procesan la información recibida del medio y del interior del organismo, respondiendo con la transmisión de impulsos eléctricos e intercambio de señales químicas.
sitio A (aminoacílico): lugar del ribosoma que recibe al tRNA con su aminoácido unido.
sitio de regulación: *véase sitio alostérico.*
sitio de restricción: secuencia de bases del DNA, generalmente de cuatro a seis (pero puede ser de ocho o más), que es cortada por una enzima de restricción determinada.
sitio peptidil: *véase sitio P.*
Slicer: ribonucleasa del complejo RISC, que corta el mRNA en el lugar al que se ha unido RISC.
Smad: tipo de proteínas involucradas en la ruta de señalización activada por el factor de crecimiento transformante β; tras su activación, Smad entra en el núcleo y regula la expresión génica.
SNAP: *véase proteína soluble de unión a NSF.*
SNAP, proteína receptora de: *véase SNARE.*
SNARE, hipótesis: modelo que explica cómo la membrana de la vesícula se fusiona con la membrana diana apropiada; basada en las interacciones entre v-SNAREs (receptores de SNAP de la vesícula) y t-SNAREs (receptores de SNAP en la membrana diana).
SNARE (receptor de SNAP): proteínas implicadas en la clasificación y distribución de vesículas; incluye a las v-SNARES, propias de la vesícula y a las t-SNARES, de las membranas diana.
snoRNA: grupo de RNAs nucleolares pequeños, que se unen a regiones complementarias de pre-rRNAs, señalándolas como lugares de metilación o escisión.
SNPs: *véase polimorfismo simple de nucleótidos.*
snRNA: molécula de RNA nuclear pequeño, que se une a proteínas específicas, para formar una snRNP, que, a su vez, se ensambla con otras snRNPs, formando el orgánulo de ayuste (*spliceosome*).
snRNP: complejo RNA-proteína que se une a otras snRNPs para formar el orgánulo de ayuste (*spliceosome*).; se pronuncia «snerp»
sobrecruzamiento: intercambio de segmentos de DNA entre cromosomas homólogos.
sobrenadante: material que queda en solución después de que las partículas de un tamaño y densidad dadas, hayan sido eliminadas en forma de *pellet*, durante centrifugación.
soluto: substancia disuelta en un disolvente, formando una disolución.
sombreado: deposición sobre una muestra biológica de una lámina fina de un metal denso a los electrones; el metal se proyecta desde unos electrodos calentados a elevada temperatura, de manera que sólo las superficies que miran hacia éstos quedan recubiertas.
sonda (ácido nucleico): ácido nucleico de cadena sencilla usado en experimentos de hibridación, para identificar otros ácidos nucleicos de secuencias complementarias a las de la sonda.
sonda de ácido nucleico: *véase sonda.*
sonda microscópica de barrido: instrumento que visualiza las características superficiales de las moléculas, usando una sonda muy fina, que se desplaza sobre la superficie de la muestra.
Sos: factor intercambiador de nucleótidos de guanina, que estimula la liberación del GDP unido a Ras, lo que permite la adquisición de una molécula de GTP, quedando Ras, activo. La proteína Sos se activa por interacción con la proteína GRB2, que a su vez ha sido previamente reclutada por las fosfotirosinas de receptor tirosina quinasa activado.
***Southern blotting*:** transferencia a una membrana («blotter») de nitrocelulosa o nailon, de fragmentos de DNA, previamente separados por electroforesis en gel, seguida de la hibridación con una sonda de DNA radiactiva.
***spliceosoma*:** complejo proteína-RNA que cataliza la eliminación de intrones del pre-mRNA.
SR: *véase retículo sarcoplásmico.*
SRP: *véase partícula de reconocimiento de la señal.*
SSB: *véase proteína de unión a DNA monocatenario.*
Start: punto de control cerca del final de la fase G1 del ciclo celular de levaduras, en el cual se puede detener el ciclo hasta que las condiciones sean las favorables para progresar hacia la fase S; se denomina *punto de restricción* en otros eucariotas.
STAT: tipo de factor de transcripción activado en el citoplasma, por fosforilación catalizada por la quinasa Janus activa, seguida de emigración de STAT activo hacia el núcleo.
subfragmento de la miosina 1 (S1): fragmento proteolítico de miosina, que se une a los microfilamentos de actina, siguiendo un patrón en forma de punta de flecha, con todas las moléculas S1 apuntando en la misma dirección.
subunidad catalítica: subunidad enzimática que contiene el centro catalítico.
subunidad reguladora: subunidad de una enzima multimérica, que porta un sitio alostérico.
subunidad ribosómica grande: componente del ribosoma, cuyo coeficiente de sedimentación es de 60S en eucariotas y 50S en procariotas; se asocia con la subunidad menor, para formar el ribosoma funcional.

subunidad ribosómica pequeña: componente del ribosoma con un coeficiente de sedimentación de 40S en eucariotas y 30S en procariotas; se asocia con la subunidad grande para formar el ribosoma funcional.
succinato-coenzima Q oxidoreductasa: *véase complejo II.*
superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF): familia de proteínas de la superficie celular implicadas en fenómenos de adhesión célula-célula, que están relacionadas estructuralmente con las subunidades de las inmunoglobulinas de las moléculas de anticuerpos.
surco telofásico: surco que rodea a las células animales durante su división, y que va progresando hasta conseguir la escisión del citoplasma.
SWI/SNF: familia de proteínas que remodelan la cromatina.

T

T: *véase timina.*
tasa de empaquetamiento del DNA: relación entre la longitud de una molécula de DNA y la del cromosoma o fibra en los cuales está empaquetado; se emplea para estimar el grado de enrollamiento y plegamiento del DNA.
TBP: *véase proteína de unión a TATA.*
TE: *véase elemento de transición.*
tecnología del DNA recombinante: conjunto de técnicas de laboratorio que permiten la unión de fragmentos de DNA, que provienen de dos o más fuentes.
tejido diana: tejido que se ve afectado específicamente por una determinada hormona, por poseer receptores para la misma, sea en la membrana plasmática o en el interior celular.
telofase: etapa final de la mitosis o la meiosis, en la que los cromosomas alcanzan los polos del huso y reaparece la envuelta nuclear.
telomerasa: tipo particular de DNA polimerasa, que cataliza la formación de copias adicionales de una secuencia repetitiva telomérica.
telómero: sequence de DNA localizada en ambos extremos de un cromosoma lineal; contiene una secuencia única de DNA, repetida en tándem.
TEM: *véase microscopio de electrónico de transmisión.*
temperatura de fusión del DNA (T_m): temperatura de transición, a la cual la mitad del DNA es de doble cadena y la otra mitad de cadena sencilla, durante la desnaturalización térmica del DNA.
temperatura de transición (T_m): temperatura a la cual la fluidez de una membrana sufre un abrupto descenso («congelación»); si la temperatura vuelve a elevarse, la membrana se hace más fluida («fusión»); viene determinada por los tipos de ácidos grasos presentes en la bicapa.
teoría: hipótesis que ha sido contrastada en muy diferentes condiciones —generalmente por diferentes investigadores, usando múltiples estrategias— y que constantemente apoya las evidencias.
teoría celular: teoría que establece que todos los organismos están formados por una o más células, que éstas son las unidades básicas de todo organismo vivo y que las células se forman siempre a partir de células preexistentes.
teoría cromosómica de la herencia: teoría que establece que los caracteres hereditarios residen en los cromosomas del núcleo.
teoría endosimbionte: teoría que propone que las mitocondrias y los cloroplastos derivan de bacterias ancestrales, que fueron ingeridas por células eucariotas hace unos mil millones de años
terapia molecular dirigida: desarrollo de fármacos dirigidos específicamente contra moléculas que son críticas para las células cancerosas.
terminal axónico: región próxima al extremo de un axón, donde se almacenan las moléculas del neurotransmisor, empleadas para transmitir señales en la sinapsis.
termodinámica: área de la ciencia que trata de las leyes que gobiernan las transacciones energéticas, que acompañan a todos los procesos físicos y reacciones químicas.
terpeno: lípido derivado del compuesto de cinco carbonos isopreno y sus derivados, unidos en diferentes combinaciones.
test de Ames: prueba de muestreo de posibles carcinógenos, que permite reconocer sustancias que causan mutaciones en bacterias.
test PSA: técnica de muestreo para la detección precoz del cáncer de próstata, que mide la cantidad de antígeno prostático (PSA) presente en sangre.
tetraédrico, átomo de carbono: átomo de carbono del que parten cuatro enlaces simples y equidistantes hacia otros átomos, haciendo que parezca un tetraedro de cuatro lados iguales.
TGFβ: *véase factor de crecimiento transformante β.*
TGN: *véase red trans-Golgi.*
TIC: translocasa de la membrana interna del cloroplasto; complejo transportador implicado en la importación de polipéptidos específicos en el cloroplasto.
tilacoide: sacos de membrana aplastados, suspendidos en el estroma del cloroplasto, a menudo organizados en pilas denominadas grana; contiene los pigmentos, enzimas y transportadores electrónicos implicados en la fase lumínica de la fotosíntesis.
tilacoide del estroma: membrana que interconecta, unas con otras, las pilas de grana de los tilacoides.
TIM: translocasa de la membrana mitocondrial interna; complejo transportador implicado en la importación de polipéptidos en la mitocondria.
timina (T): base nitrogenada designada químicamente como pirimidina, que sirve como unidad de información, cuando está formando parte de una secuencia de bases, en un ácido nucleico; se complementa, por puentes de hidrógeno, con la base adenina (A).
tinción: incubación de muestras de tejido en una solución de un colorante, un metal pesado u otra sustancia que se una específicamente a los constituyentes celulares, haciendo que éstos adquieran color o densidad electrónica.
tinción negativa: técnica de microscopia electrónica de transmisión, en la cual, la muestra no teñida, se visualiza frente un fondo teñido de oscuro.
TIRF: *véase microscopia de reflexión interna total fluorescente.*
TLC: *véase cromatografía de capa fina.*
T_m: *véase temperatura de transición* o *temperatura de fusión del DNA.*
TOC: translocasa de la membrana externa del cloroplasto; complejo transportador implicado en la importación de polipéptidos en el cloroplasto.
TOM: translocasa de la membrana externa de la mitocondria; complejo transportador implicado en la importación de polipéptidos específicos de la mitocondria.
tonofilamento: filamento intermedio que se extiende por la célula desde la placa de un desmosoma, anclándolo al citoplasma; formado principalmente por las proteínas queratina, desmina o vimentina, dependiendo del tipo celular.
topoisomerasa: enzima que cataliza la interconversión entre las formas relajada y superenrollada del DNA, mediante rupturas transitorias en una o las dos hebras.
trabajo: transferencia de energía desde un lugar a otro, o desde una forma a otra, mediante cualquier sistema que no sea el flujo de calor.
trabajo mecánico: energía necesaria para producir un cambio físico en la posición u orientación de una célula o parte de ella.
traducción: proceso en el cual la secuencia de bases de una molécula de mRNA, guía la incorporación de los aminoácidos en una cadena polípeptídica; tiene lugar en los ribosomas.
transcitosis: endocitosis cuyas vesículas se desplazan con el material ingerido hacia el otro lado de la membrana plasmática, donde lo liberan hacia espacio extracelular.
transcripción: proceso en el cual la RNA polimerasa utiliza una hebra del DNA como molde, para guiar la síntesis de una molécula complementaria de RNA .
transcriptasa inversa: enzima que usa un molde de RNA para sintetizar una molécula complementaria de DNA de doble hebra.
transcrito primario: molécula de RNA producida por transcripción, antes de que tenga lugar el procesamiento.
transducción: transferencia de secuencias del DNA de una bacteria a otra, mediante un bacteriófago.
transducción de señales: detección de señales específicas en la superficie celular y mecanismo por el cual tales señales se transmiten hacia el interior de la célula, resultando en cambios en el comportamiento celular o en la expresión génica.
transfección: introducción de DNA exógeno en una célula, en condiciones artificiales.
transferencia de energía resonante: mecanismo por el cual la energía de una molécula excitada por la luz, se transfiere a un electrón de la molécula adyacente, siendo éste impulsado a un orbital más energético; este fenómeno se produce en la transferencia de energía de una molécula de pigmento a otra, durante la transducción de la energía fotosintética.
transferencia nuclear: técnica experimental en la cual se transfiere el núcleo de una célula a otra (generalmente un oocito), a la cual se le ha extraído previamente su propio núcleo.
transformación: *véase transformación genética.*
transformación genética: cambio en las propiedades hereditarias de una célula, debido a la presencia de un DNA exógeno.
transgénico: organismo cuyo genoma contiene un gen proveniente de otro organismo, que ha

sido introducido experimentalmente, usando técnicas de ingeniería genética.

transición de fase: cambio entre los estados fluido y de gel, en una membrana.

translocación: movimiento del mRNA a lo largo del ribosoma, en saltos de tres nucleótidos, que sitúan al siguiente codón en la posición correcta para ser traducido. (*Nota*: El mismo término, que literalmente significa «cambio de lugar» puede hacer también referencia al paso de una proteína a través de un translocador de membrana o a la transferencia de un segmento de un cromosoma a otro no homólogo. *Véase también translocación cromosómica.*

translocación cromosómica: intercambio de segmentos entre cromosomas no homólogos.

translocador de fosfolípidos (flipasa): proteína que cataliza el movimiento de fosfolípidos de membrana, desde una monocapa a la otra (*flip-flop*).

translocador de protones: canal de membrana a través del cual fluyen los protones, impulsados por el gradiente electroquímico; como ejemplos están el canal CF_O de la membrana del tilacoide y el F_O de la membrana mitocondrial interna.

translocón: estructura de la membrana del RE que lleva a cabo la translocación de los polipéptidos recién formados, a través de (o insertando en) la membrana.

transportador de glucosa (GluT): proteína transportadora de membrana, responsable de la difusión facilitada de la glucosa.

transportador (del complejo del poro nuclear): proteína granular localizada en el centro del complejo del poro, que supuestamente intercambia moléculas a través de la envuelta nuclear.

transporte: movimiento selectivo de sustancias a través de una membrana, tanto de entrada, como de salida de la célula o de los orgánulos.

transporte acoplado: transporte coordinado de dos solutos a través de una membrana, de forma que si se detiene el paso de uno de ellos, lo hace también el del otro; los dos solutos se pueden mover en una misma dirección (simporte) o en direcciones opuestas (antiporte).

transporte activo: transporte a través de membrana, mediado por un sistema protéico, que mueve sustancias en contra de gradiente de concentración o electroquímico; es un proceso dependiente de energía.

transporte activo directo: transporte de membrana en el que el movimiento de solutos a su través, está acoplado directamente a una reacción química exergónica, generalmente la hidrólisis de ATP.

transporte activo indirecto: transporte de membrana que permite el cotransporte de dos solutos, en el que el movimiento a favor de gradiente de uno de ellos, impulsa el paso en contra de gradiente del otro.

transporte anterógrado: movimiento de materiales desde el RE a la membrana plasmática, a través del complejo de Golgi.

transporte axonal rápido: movimiento anterógrado y retrógrado de vesículas y orgánulos, a lo largo del axón, mediado por microtúbulos.

transporte de electrones: proceso de reoxidación de coenzimas en condiciones anaeróbicas, que supone la transferencia de los electrones hacia el oxígeno, atravesando secuencialmente una serie de transportadores de electrones.

transporte intraflagelar: movimiento de componentes desde y hacia el extremo de los flagelos, mediado por proteínas motoras, que caminan hacia los extremos *más* y *menos* .

transporte retrógrado: movimiento de retorno de vesículas desde las cisternas de Golgi hacia el retículo endoplásmico.

trasposon: secuencia del DNA que se puede mover de un lugar a otro del cromosoma.

***treadmilling* (cinta sin fin) de microtúbulos:** proceso por el cual la adición de moléculas de tubulina al extremo *más* de un microtúbulo, está en continuo balance con la pérdida de moléculas de tubulina por el extremo *menos*, sin que cambie la longitud del microtúbulo.

triacilglicerol: molécula de glicerol con tres ácidos grasos unidos a él; se llama también triglicérido.

tríada: region en la que el túbulo T pasa entre las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico, en el músculo esquelético.

triesqueleto: estructura formada por moléculas de clatrina, consistente en tres polipéptidos que radian desde un vértice central; unidad básica para ensamblaje de cubiertas de clatrina.

triglicérido: *véase triacilglicerol.*

tRNA: *véase RNA de transferencia.*

tRNA de iniciación: molécula de RNA de transferencia que inicia la traducción; reconoce el codón de iniciación AUG y lleva formilmetionina, en procariotas y metionina, en eucariotas.

tRNA supresor: molécula de tRNA mutante que inserta un aminoácido en el lugar de un codón de terminación, generado por otra mutación, que hubiera causado un final prematuro de la síntesis de una proteína.

tropomiosina: proteína filamentosa larga, asociada con los filamentos finos de las células musculares; forma parte del interruptor sensible a calcio que activa la contracción muscular; bloquea la interacción entre actina y miosina, en ausencia de iones calcio.

troponina: complejo de tres polipéptidos (TnT, TnC, and TnI) que funciona como componente del interruptor sensible a calcio que activa la contracción muscular; desplaza a la tropomiosina en presencia de iones calcio, lo que activa la contracción.

t-SNARE (*target-SNAP receptor*): proteína asociada a la superficie de una membrana diana, que se une a una proteína v-SNARE de la superficie de una vesícula de transporte apropiada.

tubulina: familia de proteínas relacionadas, que forman los bloques con los que se construyen los microtúbulos. *Véase* también *tubulina alfa, tubulina beta* y *tubulina gamma.*

tubulina α: proteína que se une a tubulina β, formando el heterodímero que sirve de unidad básica para la formación de microtúbulos.

tubulina β: proteína que se une a tubulina α para formar el heterodímero que sirve de unidad básica para la formación de microtúbulos.

tubulina gamma (tubulina γ): forma de tubulina localizada en el centrosoma, donde sirve para la nucleación de los microtúbulos.

túbulo A: microtúbulo completo que se fusiona al microtúbulo incompleto B, formando un doblete externo del axonema de cilios y flagelos de células eucariotas.

túbulo B: microtúbulo incompleto que se fusiona a otro completo (túbulo A), para formar cada uno de los dobletes externos del axonema de cilios y flagelos de células eucarióticas.

túbulos T: *véase sistema de túbulos transversales.*

tumor: masa creciente de células, causada por la proliferación celular incontrolada. *Véase también tumor benigno y tumor maligno.*

tumor benigno: tumor de crecimiento local, incapaz de invadir tejidos próximos o extenderse a otras partes del cuerpo.

tumor maligno: tumor que puede invadir los tejidos vecinos y propagarse al resto del cuerpo, principalmente por el torrente sanguíneo; se denomina también cáncer.

U

U: *véase uracilo.*

ubicuitina: pequeña proteína que se une a otras a las cuales marca para su degradación en los proteasomas.

ultracentrífuga: instrumento capaz de generar fuerzas centrífugas suficientemente grandes para separar estructuras subcelulares y macromoléculas, en función de su tamaño, forma y densidad.

ultramicrotomo: instrumento usado para obtener secciones ultrafinas para el microscopio electrónico, de material biológico previamente incluido.

unidad de transcripción: segmento de DNA cuya transcripción origina una molécula única y continua de RNA.

unidad Svedberg: unidad para la expresión del coeficiente de sedimentación de macromoléculas biológicas: Una unidad Svedberg = 10^{-13} segundos. En general, cuanto mayor es la masa de una partícula, tanto mayor es la tasa de sedimentación, si bien la relación no es lineal.

unión adherente: unión adhesiva entre células, que se conecta con el citoesqueleto, a través de filamentos de actina.

unión adhesiva (de anclaje): unión intercelular que enlaza el citoesqueleto de una célula con el de otras vecinas o con la matriz extracelular; incluye a los desmosomas, hemidesmosomas y uniones adherentes.

unión celular: especialización de la membrana plasmática de células adyacentes, que proporciona adherencia, estanqueidad o capacidad de comunicación.

unión de anclaje: *véase unión adherente.*

unión de extremos no homólogos: mecanismo de reparación del DNA de doble cadena, basado en el uso de proteínas que se unen a los extremos de los dos fragmentos escindidos de DNA, empalmándolos.

unión estrecha (*tight*): tipo de unión celular en la cual las membranas plasmáticas adyacentes de células animales vecinas, se sellan impidiendo la difusión desde una parte a otra de un estrato de células epiteliales, a través de los espacios extracelulares.

unión *gap* (comunicante): tipo de unión celular que permite el contacto íntimo entre dos células adyacentes, con intercambio de iones y moléculas pequeñas.

unión interdoblete: anclaje entre dos dobletes adyacentes del axonema de un cilio o un flagelo; se supone que limita el desplazamiento de un doblete respecto al otro, mientras se dobla el axonema.

unión neuromuscular: lugar en el que el axón de una célula nerviosa contacta con una célula

muscular esquelética, con el propósito de trasmitir impulsos eléctricos.
uniones e interacciones no covalentes: fuerzas de atracción en las que no se comparten electrones; como ejemplos están los enlaces iónicos, los enlaces de hidrógeno, las interacciones de van der Waals y las atracciones hidrófobas.
uniporte: proteína de membrana de transporte de un único soluto desde un lado de la membrana al otro.
***upstream*:** localizado hacia el extremo 5′ de la hebra codificante del DNA.
uracilo (U): base nitrogenada designada químicamente como pirimidina, que sirve como unidad de información, cuando está formando parte de una secuencia de bases del RNA; se complementa, por puentes de hidrógeno, con la base adenina (G).
UV: *véase radiación ultravioleta.*

V

***v*:** *véase velocidad de reacción inicial.*
vacuola: orgánulo de membrana del citoplasma, usado para el almacenamiento temporal o el transporte; en células vegetales es un compartimiento de carácter ácido.
vacuola autofágica: vacuola formada cuando un orgánulo viejo o inservible, u otra estructura celular, son englobados por una membrana derivada del retículo endoplasmático y posteriormente digeridos por enzimas lisosomales.
vacuola central: orgánulo de membrana, de gran tamaño, que aparece en muchas células vegetales; colabora en el mantenimiento de la presión de turgor; tiene una cierta capacidad de almacenamiento de sustancias y es también capaz de cumplir la función lisosomal.
vacuola fagocítica: estructura rodeada de membrana que contiene partículas ingeridas del medio y que se fusionará con un endosoma tardío o madurará directamente hacia lisosoma, formando una gran vesícula en la que tendrá lugar la digestión del material ingerido.
valencia: indicación del número de átomos con los cuales se puede combinar un átomo dado.
valor C: contenido de DNA en un juego haploide de cromosomas.
vector de clonación: molécula de DNA al que se ha unido un fragmento de DNA seleccionado, que se replica en una célula huésped (generalmente una bacteria); los vectores de clonación más usados son los fagos y los plásmidos.
vegetales CAM: aquellos que llevan a cabo el ciclo del metabolismo ácido de crasuláceas.
velocidad de reacción inicial (v): Tasa de reacción medida en un período de tiempo durante el cual, ni la concentración de sustrato ha descendido tanto, ni la cantidad de producto ha aumentado lo suficiente, para que afecten significativamente a la velocidad de reacción.
velocidad de sedimentación: velocidad a la que se mueve una molécula o partícula en una solución, cuando se somete a la fuerza centrífuga.
velocidad máxima (V_{max}): límite superior de la velocidad de reacción al que se aproxima una reacción catalizada enzimáticamente, cuando la concentración de sustrato se acerca al infinito.
vesícula cubierta: cualquiera de las vesículas membranosas implicadas en el tráfico vesicular del sistema de endomembranas; están rodeadas por cubiertas proteicas de clatrina, COPI, COPII o caveolina.
vesícula de endocitosis: vesícula que se forma por el desprendimiento de pequeños sectores de la membrana plasmática, durante el proceso de endocitosis.
vesícula de neurosecreción: vesícula pequeña que contiene las moléculas del neurosecreción; localizada en el terminal axónico.
vesícula de secreción: compartimiento rodeado de membrana, propio de células eucariotas, que lleva proteínas de secreción desde el complejo de Golgi hasta la membrana plasmática, sirviendo como lugar de almacenamiento, hasta que descargan su contenido por exocitosis; las vesículas grandes y densas suelen recibir el nombre de gránulos de secreción.
vesícula de transición: vesícula que transporta lípidos y proteínas desde el retículo endoplásmico al complejo de Golgi.
vesícula de transporte: vesículas que se forman en una membrana de una región de la célula y se fusionan con otras membranas; incluye a las vesículas que llevan lípidos y proteínas desde el RE al complejo de Golgi, entre las cisternas del Golgi y desde el complejo de Golgi a diferentes destinos celulares, entre los que se incluyen las vesículas de secreción, los endosomas y los lisosomas.
vesícula lanzadera: vesícula que parte de una cisterna del complejo de Golgi y se fusiona con otra.
vía secretora: ruta en la cual las proteínas recién sintetizadas se desplazan desde el RE, a través del complejo de Golgi, hasta las vesículas y gránulos de secreción, que descargarán su contenido hacia el exterior de la célula.
videomicroscopia digital: técnica de filmación electrónica de imágenes obtenidas en el plano focal de las lentes oculares.
viroide: molécula pequeña de RNA circular, que puede infectar y replicarse en células huésped, incluso cuando no codifique ninguna proteína
virus: parásito subcelular compuesto de una cubierta proteica y DNA o RNA, incapaz de existir por sí solo; invade e infecta a las células, redirigiendo la maquinaria sintética de éstas hacia la producción de más virus.
virus de Epstein-Barr (EBV): virus asociado con el linfoma de Burkitt's (así como con la condición no cancerosa de la mononucleosis infecciosa).
virus oncogénico: virus causante de cáncer.
V_m: *véase potencial de reposo de membrana.*
V_{max}: *véase velocidad máxima.*
VNTR: *véase repeticiones en tandem de número variable.*
voltaje: *véase potencial.*
voltaje de aceleración: diferencia de potencial entre el cátodo y el ánodo de un microscopio electrónico, responsable de la aceleración de electrones antes de su emisión por el cañón.
v-SNARE (*vesicle-SNAP receptor*): proteína asociada a la superficie de una vesícula de transporte, que se une a una proteína t-SNARE de la superficie de la membrana diana apropiada.

X

xenobiótico: compuesto químico ajeno a los organismos biológicos.
xeroderma pigmentosum: susceptibilidad hereditaria al cáncer (principalmente cáncer de piel) causada por defectos en los sistemas de reparación por escisión del DNA o por síntesis translesión del DNA.

Y

YAC: *véase cromosoma artificial de levaduras.*

Z

zigotene: etapa de la profase I de la meiosis, cuando los cromosomas homólogos están fuertemente apareados, debido al proceso de sinapsis.
zigoto: célula diploide formada por la reunión de dos gametos haploides.
zona activa: región de la membrana presináptica del axón a la cual se fusionan las vesículas del neurotransmisor o las vesículas de neurosecreción.
zona H: región clara situada en la mitad de la banda A de las miofibrillas del músculo estriado.

Créditos de fotos e ilustraciones

Créditos de las fotos

Capítulo 1 01.04a, b From Cell Ultrastructure, by William A. Jensen and Roderic B. Park. Copyright ©1967 by Wadsworth Publishing Co., Inc. Used by permission of the authors and publisher. 01.04a, b Dr. Judith Croxdale. Tabla 01.01(1) ©Biophoto Associates/Photo Researchers, Inc. Tabla 01.01(2, 4, 5) ©David M. Phillips/Visuals Unlimited. Tabla 01.01(3) ©Ed Reschke. Tabla 01.01(6) Courtesy of Noran Instruments.

Capítulo 2 02.13a, b Don Fawcett/Photo Researchers, Inc. 02.14a Courtesy of G. F. Bahr, Armed Forces Institute of Pathology. 02.14b Courtesy E. H. Newcomb. 02.14c Courtesy of Eva Frei & R. D. Preston. 02.19 © Graphics Systems Research, IBM UK Scientific Centre.

Capítulo 3 03.24a Jeremy Burgess/Photo Researchers, Inc. 03.24b Don Fawcett/Photo Researchers, Inc. 03.25 Courtesy of Eva Frei & R. D. Preston. 3A.1 Barrington Brown/Photo Researchers, Inc.

Capítulo 4 04.02 Susumu Ito. 04.03 Courtesy of Gregory J. Brewer, Southern Illinois University. 04.04 Courtesy E. H. Newcomb. 04.05b Courtesy of Richard Rodewald/Biological Photo Service. 04.06b Micrograph by W. P. Wergin; provided by E. H. Newcomb. 04.07 Courtesy of Hans Ris. 04.08 Oscar L. Miller, Jr., University of Virginia. 04.10b Courtesy of Richard Rodewald/Biological Photo Service. 04.10c From J. P. Strafstrom and L. A. Staehelin, *The Journal of Cell Biology* 98 (1984): 699. Reproduced by copyright permission of The Rockefeller University Press. 04.11c Keith Porter/Photo Researchers, Inc. 04.12b From J. B. Rattner and B. R. Brinkley, *J. Ultrastructure Res.* 32(1970): 316. Copyright ©1970 by Academic Press. 04.13 Courtesy of S. M. Wang. 04.13b Courtesy of Clara Franzini-Armstrong. 04.14 Micrograph by W. P. Wergin; provided by E. H. Newcomb. 04.15c Courtesy of H. Stuart Pankratz/Biological Photo Service. 04.15d Courtesy of Barry J. King/Biological Photo Service. 04.16 Courtesy E. H. Newcomb. 04.18b M. Simionescu and N. Simionescu, *J. Cell Biol.* 70(1976):608. Reproduced by copyright permission of The Rockefeller University Press. 04.18c Don Fawcett/Visuals Unlimited. 04.19 ©Barry King/Biological Photo Service. 04.20 From S. E. Frederick and E. H. Newcomb, *Journal of Cell Biology* 43(1969): 343. Reproduced by copyright permission of the Rockefeller University Press; photo provided by E. H. Newcomb. 04.21b Micrograph by P. J. Gruber; provided by E. H. Newcomb. 04.23 From Sigrid Regauer, Werner W. Franke, and Ismo Virtananen, *Journal of Cell Biology* 100 (1988): 997-1009. Reproduced by copyright permission of the Rockefeller University Press. 04.25 From P. H. Raven, R. F. Evert, and H. A. Curtis, *Biology of Plants,* 2nd ed. New York: Worth Publishers, Inc., 1981. Used with the permission of Worth Publishers. 04.26a-c Courtesy of R. C. Williams and H. W. Fisher.

Capítulo 5 05.03 From D. A. Cuppels and A. Kelman, *Phytopathology* 70 (1980): 1110. Photo provided by A. Kelman. Copyright ©1980 by the American Phytopathological Society. 05.06 © Krzysztof Kozminski.

Capítulo 6 06.06 Richard J. Feldmann, National Institutes of Health.

Capítulo 7 07.01a M. Simionescu and N. Simionescu, *J. Cell Biol.* 70(1976): 622. Reproduced by copyright permission of The Rockefeller University Press. 07.01b Courtesy E. H. Newcomb. 07.03e Micrograph courtesy of J. David Robertson. 07.04 Courtesy of Don W. Fawcett, M.D., Harvard Medical School. 07.16b Micrographs of E and P faces courtesy of Philippa Claude. 07.17a Courtesy of Daniel Branton. 07.17b Courtesy of R. B. Park. 07.18a & b Courtesy of David Deamer, University of California, Santa Cruz. 07.20a Ken Eward/Science Source/Photo Researchers, Inc. 07.27 Courtesy of Susumu Ito. 07.29 Courtesy of A. E. Sowers.

Capítulo 8 08.14a ©Helen E. Carr/Biological Photo Service.

Capítulo 9 9A.1 Deborah Davis/PhotoEdit.

Capítulo 10 10.02 Courtesy of Charles R. Hackenbrock. 10.03 Courtesy of M. L. Vorbeck. 10.04 Keith R. Porter, University of Pennsylvania. 10.05 From L. Packer, *Ann. New York Academy of Sciences* 227 (1974): 166. Copyright ©1974 by the New York Academy of Sciences. Photo provided by H. T. Ngo. 10.06 Courtesy of A. Tzagoloff from *Mitochondria* (New York: Plenum, 1982). 10A.01 From R. N. Trelease, P. J. Gruber, W. M. Becker, and E. H. Newcomb, *Plant Physiology* 48 (1971): 461.

Capítulo 11 11.02a Micrograph by M. W. Steer; provided by E. H. Newcomb. 11.02b Courtesy of Professor Linda Graham, Department of Botany, University of Wisconsin, Madison. 11.03a, c Micrographs by W. P. Wergin; provided by E. H. Newcomb. 11.04 N. J. Lang/Biological Photo Service. 11.11 Hartmut Michel, Max Planck Institute of Biophysics, Frankfurt, Germany, and Johann Deisenhofer, University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas. Fig. 11.17b ©R. W. Van Norman/Visuals Unlimited.

Capítulo 12 12.02a Courtesy of Don W. Fawcett, M.D., Harvard Medical School. 12.02b Courtesy of M. Bielinska. 12.03a © Barry King/Biological Photo Service. 12.04b Courtesy Michael J. Wynne. 12.05 Courtesy of William G. Dunphy with Ruud Brands and James E. Rothman, *Cell* 40 (1985): 467, Fig. 6, Panel B. 12.11 From L. Orci and A. Perrelet, *Freeze-Etch Histology*. Heidelberg: Springer-Verlag, 1975. 12.16 From M. M. Perry and A. B. Gilbert, *The Journel of Cell Science* 39 (1979): 257. Copyright © 1979 by The Company of Biologists Ltd. 12.17a Micrograph courtesy of J. Heuser. 12.17b Micrograph courtesy of N. Hirokawa and J. E. Heuser from D. W. Fawcett. 12.18a Micrograph courtesy of J. Heuser. 12.20b Courtesy of Pierre Baudhuin. 12.22 Courtesy of Zdenek Hruban. 12.24 Eldon H. Newcomb/Biological Photo Service. 12B.02a, b R. G. W. Anderson, M. S. Brown, and J. L. Goldstein, *Cell* 10 (1977): 351-64.

Capítulo 13 13.16a Courtesy of G. L. Scott, J. A. Feilbach and T. A. Duff. 13.19c Courtesy of S. G. Waxman. 13.22 M. L. Harlow et al., «The architecture of active zone material at the frog's neuromuscular junction», from *Nature* 409: 479-84. Reprinted by permission from *Nature* © 2001, Macmillan Magazines Ltd. Image courtesy Mark L. Harlow, Stanford University. 13.23a From J. Cartaud, E. L. Bendetti, A. Sobel, and J. P. Changeux, *Journal of Cell Science* 29 (1978): 313. Copyright ©1978 The Company of Biologists, Ltd. 13.24b Courtesy of E. R. Lewis, University of California, Berkeley. 13.25 Courtesy of H. Shio and P. B. Lazarow. Reproduced by copyright permission of The Rockefeller University Press; photo provided by P. B. Lazarow.

Capítulo 14 14.11 Courtesy of R. D. Burgoyne. 14.14 Courtesy of Y. Hiramoto. 14.20 Enrique Amaya with Thomas J. Musci and Marc Kirschner 1991, *Cell* 66. Courtesy of Marc Kirschner. 14.25b-d © Walter Malorni et al., from «Morphological aspects of apoptosis». Image courtesy Walter Malorni, Istituto Superiore de Sanita, Rome. 14A.01a,b Courtesy of David A. Wassarman, University of Wisconsin. 14A.01c Courtesy of Marek Mlodzik, Mt. Sinai School of Medicine. 14A.01d, e Reprinted from *Cell* 55, R. Reinke and S.L. Zipursky, «Cell-Cell Interaction in the *Drosophila* Retina», p. 321, 1988, with permission from Elsevier. 14A.04 Courtesy of Bob Goldstein, University of North Carolina.

Capítulo 15 15.01a-c Courtesy of Mark S. Ladinsky, University of Colorado at Boulder. 15.02b Courtesy of L. E. Roth, Y. Shigenaka, and D. J. Pihlaja/Biological Photo Service. 15.05 Lester Binder and Joel Rosenbaum, *Journal of Cell Biology* 79 (1978): 510. Reproduced by copyright permission of the Rockefeller University Press. 15.09b Courtesy of Kent L. McDonald. 15.09d Mitchison and Kirschner, *Nature* 312 (1984): 235, Fig. 4c. 15.10a Courtesy of Michelle Moritz with Michael B. Braunfield, John W. Sedat, Bruce Alberts and David A. Agard, *Nature* 378: 555, Fig. 1, Panel B.2. 15.8 L. Casimeris, N. Pryer, and E. Salmon, *Journal of Cell Biology* 107 (1988): 2226. Reproduced by copyright permission of the Rockefeller University Press. 15.12 Adapted from C. E. Schutt et al., *Nature* (1993) 365: 810; courtesy of M. Rozycki. 15.13b Courtesy of R. Niederman and J. Hartwig. 15.14c Courtesy of Roger Craig. 15.20a M. S. Mooseker and L.G. Tilney, *Journal of Cell Biology* (1975) 67: 725-43. Reproduced by copyright permission of the Rockefeller University Press. 15.16 Courtesy of J. Hartwig. 15.17a, b © Borisylab, Northwestern University Medical School. Image courtesy Borisylab. 15.17c L. Blanchoin, K. J. Amann, et al., «Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins», from *Nature* 404 (6781):1007-11 (Fig. 1J). Reprinted by permission from *Nature,* © 2000 Macmillan Magazines Ltd. Image courtesy Kurt J. Amann, The Salk Institute. 15.18 Courtesy of Alan Hall, University College, London, and Kate Nobes, University of Bristol. 15.22 Micrograph courtesy of Daniel Branton. 15.23 P. A. Coulombe et al., «The 'ins' and 'outs' of intermediate filament organization», from Trends in Cell Biology 10: 420-28, Fig. 1. © 2000. Reprinted with permission from Elsevier Science. Image courtesy Pierre A. Coulombe, Johns Hopkins University. 15.24 From M. W. Aynardi, P. M. Steinert and R. D. Goldman, *Journal of Cell Biology* 98(1984): 1407. Reproduced by copyright permission of the Rockefeller University Press. 15.26 Reprinted by permission from E. Fuchs, *Science* 279: 518, Fig. D. Images: T. Svitkina and G. Borisy. Copyright 1998 American Association for the Advancement of Science. T15.01 Fig. 1 Dr. Thomas D. Pollard. T15.02 Fig. 2 Courtesy of Sammak and Borisy, *Nature* (1988) 332: 724-36, Fig. 1b. T15.02 Fig. 3a-d Reprinted from E. D. Salmon, *Trends in Cell Biology* 5: 154-58, Fig. 3, with permission from Elsevier Science. T15.02 Fig. 4 Courtesy of Dr. John Heuser. 15A.01b Courtesy of Lewis G. Tilney with Daniel Portnoy and Pat Connelly, *Journal of Cell Biology* 109:1604, Fig. 18.

Capítulo 16 16.01 Courtesy of N. Hirokawa. 16.06a W. L. Dentler/ Biological Photo Service. 16.06c Biophoto Associates/Photo Researchers, Inc. 16.07a-d Courtesy of W. L. Dentler. 16.08a Dr. Lewis Tilney, University of Pennsylvania. 16.11 Courtesy of H. Ris. 16.12 Courtesy of Clara Franzini-Armstrong. 16.17 John Heuser, M.D. 16.22 © Allen Bell/University of New England/The Benjamin/Cummings Publishing Co. 16.23 A. Hall», «Rho GTPases and the actin cytoskeleton», from *Science* 279: 509-14, Figs. A, C, E, and G. © 1998. Reprinted with permission from the American Association for the Advancement of Science. Image courtesy Kate Nobes, University College, London. 16.24 Adapted from K. M. Trybus and S. Lowey, *Journal of Biological Chemistry* 259 (1984): 8564-71. 16.26 Courtesy of G. Albrecht-Buehler. 16.28 © Laboratory of Molecular Biology 1999. A.B. Verkhovsky, T.M. Svitkina, and G.G. Borisy, *Cell Behaviour: Control and Mechanism of Motility,* 1999, 207-22. 16.30a M. Abbey/Visuals Unlimited. 16.30b Animals Animals/©Peter Parks-OSF. 16A.01 Dr. Richard Kessel and Dr. Gene Shih/Visuals Unlimited.

Capítulo 17 17.01 Dr. Richard Kessel and Dr. Gene Shih/Visuals Unlimited. 17.02a Courtesy of Jerome Gross. 17.06a Reproduced from L. Rosenberg, W. Hellmann, and A. K. Kleinschmidt (1975). *Journal of Biological Chemistry* 250:1877-83 by copyright permission of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Bethesda, MD. 17.07a Reproduced from Dr. Jean Paul Thiery, *The Journal of Cell Biology* 96 (1983): 462-73 by copyright permission of the Rockefeller University Press. 17.07b, c ©Richard Hynes, from Scientific American, June 1986. 17.08 Courtesy of G. W. Willis, M. D., and Biological Photo Service. 17.11b © Don Sakaguchi, Iowa State University. Image courtesy Don Sakaguchi. 17.11d Micrograph courtesy of Douglas E. Kelly. 17.14a-e Courtesy of Dr. Masatoshi Takeichi. 17.15a, b Courtesy of Janet Heasman, University of Minnesota. 17.18a From Douglas E. Kelly, *The Journal of Cell Biology* 28 (1966): 51. Reproduced by copyright permission of The Rockefeller University Press. 17.19c Courtesy of Philippa Claude. 17.20b Courtesy of Daniel S. Friend. 17.21b From C. Peracchia and A. F. Dulhunty, *The Journal of Cell Biology* 70 (1976): 419. Reproduced by copyright permission of The Rockefeller University Press. 17.21c Courtesy of Philippa Claude. 17.22b ©Biophoto Associates/ Photo Researchers, Inc. 17.23 ©G. F. Leedale/Photo Researchers, Inc. 17.24a, b Courtesy of K. Mühlenthaler. 17.25a Micrograph by W. P. Wergin; photo provided by E. H. Newcomb. 17.25c Courtesy E. H. Newcomb. 17.26a, b Courtesy of Werner R. Loewenstein. 17A.01 K. Ireton and P. Cossart, «Interaction of invasive bacteria with host signaling pathways», from *Current Opinions in Cell Biology* 10, no. 2: 276-83. © 1998. Reprinted with permission from Elsevier Science. Image courtesy Pascale Cossart, Institut Pasteur, Paris.

Capítulo 18 18.06b L, R Courtesy James C. Wang. 18.16a Reproduced from H. Kobayashi, K. Kobayashi, and Y. Kobayashi (1977). *Journal of Bacteriology* 132: 262-69 by copyright permission of the American Society for Microbiology. 18.16b Dr. Gopal/SPL/Photo Researchers, Inc. 18.17 Courtesy of Dr. Jack Griffith. 18.19L, R Photographs courtesy of Roger D. Kornberg. 18.21aB Dr. Jack Griffith. 18.21aT Biological Photo Service. 18.21b Courtesy of Barbara Hamkalo. 18.21c Courtesy of J. R. Paulsen and U. K. Laemmli, *Cell.* Copyright Cell Press. 18.21d, e G. F. Bahr/Armed Forces Institute of Pathology. 18.22, Courtesy of Ulrich K. Laemmli. 18.23 Courtesy of D. L. Robberson. 18.25a From L. Orci and A. Perrelet, *Freeze-Etch Histology.* Heidelberg: Springer-Verlag, 1975. 18.25b Micrograph by S. R. Tandon; provided by E. H. Newcomb 18.26a, 18.27 From L. Orci and A. Perrelet, *Freeze-Etch Histology.* Hei-

delberg: Springer-Verlag, 1975. 18.28 From A. C. Faberge, *Cell Tiss. Res.* 15 (1974): 403. Heidelberg: Springer-Verlag, 1974. 18.31a Courtesy of Jeffery A. Nickerson, Ph.D., Sheldon Penman, Ph.D., and Gariela Crockmalnic. 18.31b Courtesy of Ueli Aebi. 18.32 Courtesy of Luis Parada and Tom Misteli, National Cancer Institute, NIH. 18.33 D. Phillips/Photo Researchers, Inc. 18.34 From Sasha Koulish and Ruth G. Kleinfeld, *Journal of Cell Biology* 23 (1964): 39. Reproduced by copyright permission of The Rockefeller University Press. 18A.1 ©Lee D. Simon/Science Source/Photo Researchers, Inc. 18A.2 Courtesy of Cellmark Diagnostics, Germantown, MD. 18A.3 Bruce Iverson/Bruce Iverson. 18C.2 Cellmark Diagnostics, Inc

Capítulo 19 19.05a Courtesy of *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* (1963) 28: 44. 19.06 From D. J. Burks and P. J. Stambrook, *Journal of Cell Biology* 77 (1978): 762. Reproduced by permission of The Rockefeller University Press. Photos provided by P. J. Stambrook. 19.20a-f Ed Reschke/Ed Reschke. 19.21a-e Phototake/Carolina Biological Supply Company. 19.22b J. Richard McIntosh, University of Colorado. 19.23L J. F. Gennaro/Photo Researchers, Inc. 19.23R CNRI/ SPL/Photo Researchers, Inc. 19.26 Courtesy of Dr. Matthew Schibler, from *Protoplasma* 137 (1987): 29.44. Springer-Verlag. 19.27c, d Courtesy of Jeremy Pickett-Heaps, University of Melbourne. 19.28 David M. Phillips/Visuals Unlimited. 19.29 Micrograph by B. A. Palevitz. Courtesy E. H. Newcomb, University of Wisconsin. 19.30a-d Dr. Richard Kessel and Dr. Gene Shih/Visuals Unlimited.

Capítulo 20 20.06a-j Courtesy of B. John. 20.08a From P. B. Moens, *Chromosoma* 23 (1968): 418. Copyright © 1968 by Springer-Verlag. 20.20a Courtesy of Charles C. Brinton, Jr., and Ms. Judith Carnahan. 20.20b Omikron/Photo Researchers, Inc. 20.25 Courtesy of Ross B. Inman, University of Wisconsin, Madison.20A.01 Courtesy of Dr. Ralph L. Brinster, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania.

Capítulo 21 21.03a Bill Longcore/SS/Photo Researchers, Inc. 21.03b Jackie Lewin/Royal Free Hospital/SS/Photo Researchers, Inc. 21.04a, b Vernon Ingram. 21.15 Courtesy of D. B. Nikolov and S. K. Burley from Nikolov et al., *Nature* (1992) 360: 40-46. 21.18 From O. L. Miller, Jr., B. A. Hamkalo, and C. A. Thomas, Jr. Reprinted with permission from *Science* (1970)169: 392, Fig. 3. Copyright 1970 American Association for the Advancement of Science. 21.25a Courtesy of A. L. Beyer. 21.25b Courtesy of Jack Griffith.

Capítulo 22 22.01a Micrograph and figure adapted from J. A. Lake, *Scientific American* (1981) 245: 86. © J. A. Lake. 22.03b Reprinted with permission from Sung-Hou Kim et al., from *Science* (1974) 185:435; ©1974 by the AAAS.

Capítulo 23 23.12 From D. D. Brown and I. B. Dawid, reprinted with permission from *Science* (1968) 160: 272, Fig. 1. Copyright 1968 American Association for the Advancement of Science. 23.15a, b Sarah Elgin/Washington University. 23.16 © P. Bryant/Biological Photo Service. 23.18 Reproduced from S. Saragosti, G. Moyne, and M. Yaniv, *Cell* (1980) 20: 65-73 by copyright permission of Cell Press, Cambridge, MA. 23.25b Courtesy of IBM U.K. Ltd. 23.29b, c Courtesy of Edward B. Lewis, California Institute of Technology. 23A.01 AP/Worldwide Photos.

Capítulo 24 24.02 Courtesy of L. Hayflick. 24.20 From S.L. Robbins, *Textbook of Pathology* (Philadelphia: W.B. Saunders, 1957). 24.21 Courtesy of G.D. Abrams. 24A.01 Roberto Gonzalez, Orlando Sentinel.

Apéndice A.05 Courtesy of Leica, Inc., Deerfield, IL. A.07 M.I. Walker/Photo Researchers, Inc. A.09, A.13 Tim Ryan. A.14 S. Strome et al., «Spindle dynamics and the role of β-tubulin in early *Caenorhabditis elegans* embryos», from *Molecular Biology of the Cell* 12: 1751-64, Fig. 8. ©2001. reprinted with permission by the American Society for Cell Biology. Image courtesy of Susan Strome, Indiana University. A.15a, b © Karl Garsha, Beckman Institute for Advanced Science and Technology, University of Illinois. A.17 Courtesy Nikon USA. A.19 © Shelley Sazer, Baylor College of Medicine. Image courtesy Applied Precision, Inc. A.20a-d E.D. Salmon, *Trends in Cell Biology* 5: 154-58, Fig. 3. A.22c Mochizuki et al, «Spatio-temporal images of growth factor-induced activation of Ras and Rap 1», from *Nature* 411 (2001): 1065-68. Courtesy of M. Matsuda. Reprinted by permission of Nature Publishing Group. A.25a Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY 10594. A.26a Courtesy of Don W. Fawcett, M.D., Harvard Medical School. A.26b K. Tanaka, Osaka University, Osaka, Japan. A.27a Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY 10594. A.28a, b RMC, Inc. A.30 Jeff Hardin, University of Wisconsin. A.31 Courtesy of Dr. Michael F. Moody. A.32 Omikron/Photo Researchers, Inc. A.35 From L. Orci and A. Perrelet, *Freeze-Etch Histology* (Heidelberg: Springer-Verlag, 1975). A.36 Courtesy of H. Ris. A.39a Reprinted with permission from *Nature* 171 (1953): 740; copyright 1953 Macmillan Magazines Limited. A.39b Richard Wagner, UCSF Graphics.

Créditos de las ilustraciones

The following illustrations are from L.J. Kleinsmith and V.M. Kish, *Principles of Cell and Molecular Biology,* 2nd ed. (New York, NY: HarperCollins, 1995). Reprinted by permission of Pearson Education, Inc.:

> Figs. 3.7, 3.9, 3.13, 3.27, 7.6, 7.7, 7.8, 7.11, 7.19, 7.23, 7.24, 8.4, 8.5, 8.10, 10.16, 11.3, 11.4, 11.20a, b, 11.21a, 11.24, 11.29, 11A.1, 12.4a, 12.9, 12.14, 12.17c, d, 12.18b, 13.16b, 14.1, 14.15, 14.16, 15.6, 15.20b, 16.2, 18.8, 18.15, 18.18, 18.19, 19.2, 19.8, 19.10, 19.22a, 19.24, 20.22, 20.23, 20.24, 20.25, 20.29, 21.4, 21.5, 21.12, 21.19, 21.20, 21.22, 21.24, 21.25, 21.26, 22.4, 22.15, 23.13, 23.14, 23.26, 23.28, 23.37, 24.04, 24.05, 24.06.

Fig. 3.4: © Irving Geis

Fig. 3.6: © Irving Geis

Fig. 4.22: From P.J. Russell, *Genetics,* 5th ed. (Menlo Park, CA: Addison Wesley Longman, 1998), Fig. 13.18. Reprinted by permission of Pearson Education, Inc.

Fig. 6.7: From N.A. Campbell and J.B. Reece, *Biology,* 6th ed. (San Francisco: Pearson Education), Fig. 6.15, p. 99. Copyright 2002. Reprinted by permission of Pearson Education, Inc.

Box 6A: Reprinted with permission from T.R. Cech, *Science* (1987) 236:1532. Copyright ©1987 American Association for the Advancement of Science.

Fig. 7.30: From J. Kyte and R.F. Doolittle, *Journal of Molecular Biology* (1982)157:105-32. © Academic Press Ltd.

Fig. 13.2a: From N.A. Campbell, J.B. Reece, and L.G. Mitchell, *Biology,* 5th ed. (Menlo Park, CA: Addison Wesley Longman), p. 995. Copyright 1999. Reprinted by permission of Pearson Education, Inc.

Fig. 13.16c: From M.E.T. Boyle et al., *Neuron* 30: 385-97. ©2001.

Fig. 13.22a: From C.G. Garner et al., *Current Opinion Neurobiol.* 10: 321-27, Fig. 1. ©2000.

Fig. 14.18: From M. Berridge, *Nature* (1993) 361:315-325. Copyright 1993 Macmillan Magazines Limited.

Fig. 14.19: From S.F. Gilbert, *Developmental Biology,* 5th ed., (Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1997), p. 110. Reprinted by permission of Sinauer Associates, Inc.

Fig. 14.25a: From H. Lodish et al., *Molecular Cell Biology,* 4th ed. (New York: W.H. Freeman), p. 1045. ©2000.

Fig. 14.26: From M.O. Hengartner, *Nature* 407: 770-76. ©2000.

Fig. 15.4: From B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell,* 3rd ed., (New York, NY: Garland Publishing, Inc., 1994), p. 810. © Garland Publishing, Inc.

Fig. 15.15: From B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell,* 3rd ed., (New York, NY: Garland Publishing, Inc. 1994), p. 835. © Garland Publishing, Inc.

Fig. 16.3b: From H. Lodish et al., *Molecular Cell Biology* 4th ed (New York: W.H. Freeman, 2000).

Fig. 16.5: From I. Corthesy-Theviaz et al., *Journal of Cell Biology* (1992) 118:1333-45. Copyright permission of The Rockefeller University Press.

Fig. 16.21: From D. Bray, *Cell Movements* (New York, NY: Garland Publishing, Inc. 1992), p. 166. © Garland Publishing, Inc.

Fig. 16.27a: From C.H. Lin et al., *Neuron* (1996)16:769-782. Courtesy of Paul Forscher.

Fig. 17.2: From N.A. Campbell, J.B. Reece, and L.G. Mitchell, *Biology,* 5th ed. (Menlo Park, CA: Addison Wesley Longman), Fig. 36.3. Copyright 1999. Reprinted by permission of Pearson Education, Inc.

Fig. 17.13: From B.D. Angst, C. Marcozzi, Al Magee, *Journal of Cell Science* 114: 629-41. Copyright ©2001. Reprinted by permission of the Company of Biologists, Ltd.

Fig. 17.16: From D. Vestweber, J.E. Blanks, *Physiology Review* 79: 181-213. © 1999.

Fig. 18.12: From N.A. Campbell, J.B. Reece, and L.G. Mitchell, *Biology,* 5th ed. (Menlo Park, CA: Addison Wesley Longman, 1999), p. 377. Reprinted by permission of Pearson Education, Inc.

Fig. 20.33: From N.A. Campbell, J.B. Reece, and L.G. Mitchell, *Biology,* 5th ed. (Menlo Park, CA: Addison Wesley Longman), p. 391. Copyright 1999. Reprinted by permission of Pearson Education, Inc.

Fig. 24.03: Based on illustrations in J. Folkman, «The vascularization of tumors», from *Scientific American* vol. 234 (May 1976): 58.

Fig. 24.07: Left graph from American Cancer Society, «Cancer prevention and early detection», in *Facts & Figures* (2003): 3. Histogram data taken from *The Health Consequences of Smoking*; *Cancer: A Report of the Surgeon General—1982.* Tabla 6, p. 38, British Physicians Study, and Tabla 7, p. 39, U.S. Veterans Study.

Fig. 24.08: Data from S. Meselson and L. Russell in *Origins of Human Cancers,* H.H. Hiatt et al., eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1977), pp. 1473-82.

Fig. 24.09: Adapted from R.K. Boutwell, *Prog. Exp. Tumor Res.* 4 (1963): 207.

Fig. 24.11: Data obtained from D.E. Brash et al., *PNAS* 88 (1991): 10127, Fig. 2.

Fig. A.18: From S.M. Potter, «Vital imaging: Two photons are better than one», *Current Biology* 6: 1595-98, ©1996.

Fig. A.40: From U.B. Rawat et al., «A cryo-electron microscopic study of ribosome-bound termination factor RF2», *Nature* 421 (2003): 87-90. Reprinted by permission of Nature Publishing Group.

Índice analítico

Nota: una *b* a continuación del número de página indica duadro del anexo, una *f* indica una figura, una *n* indica una nota a pie de página y *t* indica material de una tabla. Los números de página indicados en **negrita** indican páginas en las que se definen elementos importantes.

A

B

D

G

I

J

N

O

S

U

V

W

X



El mundo de la célula es un texto actual, de gran rigor científico y muy fácil de abordar.

Los temas se presentan desde los conceptos básicos a los más elaborados, incluyendo detalles de modelos celulares que facilitan la comprensión y numerosas referencias a aspectos celulares y moleculares de la patología. Esto unido a los numerosos, claros y precisos esquemas, hace que sea un libro muy ameno.

En este contexto, podemos considerar que el presente libro representa un texto básico y con un nivel muy adecuado, para las disciplinas de Citología y Biología Celular para estudiantes de Biología, Medicina, Farmacia, Bioquímica y Odontología. Igualmente es un excelente libro de consulta para estudiantes de las diplomaturas de Óptica, Fisioterapia y Enfermería, entre otras.



El libro incluye un CD que contiene vídeos, cuestiones prácticas por capítulos, resúmenes, glosario, links especializados y un navegador para bases de datos relacionadas con la biología celular.



www.pearsoneducacion.com

